

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

**Avaliação de filmes à base de quitosana combinado com goma xantana e
hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*)**

Maria de Moraes Lima

Pelotas, 2017

Maria de Moraes Lima

**Avaliação de filmes à base de quitosana combinado com goma xantana e
hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

Prof. Dr. Carlos Prentice

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L732a Lima, Maria de Moraes

Avaliação de filmes à base de quitosana combinado com goma xantana e hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) / Maria de Moraes Lima ; Angelita da Silveira Moreira, Elessandra da Rosa Zavareze, orientadoras ; Carlos Prentice, coorientador. — Pelotas, 2017.

127 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Quitosana. 2. Goma xantana. 3. Hidrolisado proteico. I. Moreira, Angelita da Silveira, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. III. Prentice, Carlos, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Maria de Moraes Lima

Avaliação de filmes à base de quitosana combinado com goma xantana e
hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Tese aprovada como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas.

Data de defesa: 10 de março de 2017.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carlos Prentice

Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Daniela Bianchini

Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Patrícia Diaz de Oliveira

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedicatória

"Para aqueles que amo..."

Agradecimentos

A Deus por tudo, principalmente por ter me dado saúde, entusiasmo e por ter usado pessoas maravilhosas para me ajudar na realização deste projeto.

Agradeço incondicionalmente à minha família por ser minha base, meu tudo.

À professora, Dra. Angelita da Silveira Moreira, pelas orientações e por tudo que me proporcionou. Todas as experiências que vivi durante esses anos serviram para meu crescimento, hoje me sinto mais forte.

Ao meu co-orientador professor Dr. Carlos Prentice por ter me dado direção e suporte em tudo que precisei. Sem o seu apoio este trabalho não seria possível.

Aos professores Dr. Alvaro Renato Dias pela disposição e contribuição na realização de várias análises; Dra. Eleessandra Zavareze pela orientação, apoio, encorajamento e motivação que me possibilitaram crescimento; Dra. Daniela Bianchine pela doação das análises de DSC e FT-IR, pelo apoio e orientações; Dr. Mário Lúcio Moreira pela doação das análises de TGA; Dra. Miriam Galvão pela doação das análises microbiológicas; Nathan Vanier pela doação das análises de perfil de distribuição de massa; Dra. Nádia Carbonera pelo apoio e simpatia; Dr. Antonio Pinto pela colaboração para que esse trabalho fosse realizado.

À Gabriela Reissig, minha amiga de todas as horas; Lisiane Vergara, Lucia Cesar e Francisco Denis, meus amigos e companheiros de Laboratórios durante os finais de semana e feriados; Letícia Zarnott pela ajuda no processo de hidrolise; aos colegas de Laboratório de Biopolímeros pela contribuição e convivência.

Ao meu namorado pela compreensão, carinho, incentivo e colaboração. Sempre me incentivando a ser grata a tudo e a todos.

Às empresas Novozymes Latin America, Araucária Brasil pela doação de várias enzimas, CP Kelco Brasil S.A Limeira-SP pela doação da goma xantana. Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL)/FURG pela contribuição das análises de MEV e DRX. Ao Departamento de Farmácia pelo apoio.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade. Aos professores pelos ensinamentos que me transmitiram. À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À banca Examinadora pela colaboração. A todos que de alguma forma contribuíram na conclusão deste objetivo.

Resumo

Os filmes biodegradáveis vêm despertando o interesse da comunidade científica por apresentarem potencialidade como materiais de embalagens. Eles melhoram a qualidade e reduzem perdas de alimentos, além de cooperarem com a preservação do meio ambiente. Nesse sentido, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar filmes à base de quitosana combinados com goma xantana e hidrolisado de corvina (*Micropogonias furnieri*). Desta forma, este trabalho contempla quatro capítulos. No primeiro estudo, avaliou-se hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*) através da composição proximal, grau de hidrólise, atividade antioxidante, perfil de distribuição da massa molar e composição de aminoácidos. Filés de corvina foram hidrolisados com a enzima Alcalase 2.4L variando apenas o tempo, assim, foram obtidos hidrolisados com 2, 4 e 8 h de reação. Os teores de proteínas dos hidrolisados variaram de 78,28 a 82,30%, onde o hidrolisado com maior tempo de reação mostrou maior grau de hidrólise (32,1%) e maior poder de inibição da oxidação pelos métodos ABTS e DPPH (98,35% e 54,11%, respectivamente). No segundo estudo foram elaborados filmes à base de quitosana e goma xantana. Os filmes foram avaliados por seus grupos funcionais, propriedades estruturais, térmicas, morfológicas, físicas, mecânicas, ópticas e de barreira. Todos os filmes apresentaram picos endotérmicos no intervalo de 122 e 175 °C e picos exotérmicos largos acima de 200 °C, que foram atribuídos à temperatura de fusão e à decomposição térmica, respectivamente. Estes resultados demonstraram que os filmes com goma xantana têm o T_m e o $\Delta_m H$ mais elevados. Os filmes que contêm maior teor de goma xantana mostram também maior resistência à tração e a menor elongação. A adição de goma xantana não afetou a permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e umidade dos filmes. No terceiro estudo, filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) foram elaborados com o objetivo de avaliar suas propriedades antioxidantes, mecânicas, físicas, estruturais, morfológicas, térmicas e de barreira. A mistura de goma xantana e hidrolisado promoveram algumas alterações nos filmes de quitosana. A adição de goma xantana aumentou a resistência a tração e alterou os parâmetros de cor dos filmes. A adição de hidrolisado proteico de corvina propiciou significativa atividade antioxidante aos filmes, no entanto, maiores concentrações tendem aumentar a umidade e diminuir a resistência dos mesmos. Todos os filmes apresentaram uma estrutura homogênea, sem separação de fases e livres de fissuras. Não foram observadas diferenças significativas quanto à solubilidade e à permeabilidade ao vapor de água nos filmes estudados. Já no quarto estudo objetivou-se avaliar a eficiência de filmes à base de quitosana e goma xantana na conservação de filés de corvina mantidos sob refrigeração durante 9 dias. Avaliou-se a composição proximal, perda de massa, cor, pH, N-BVT (Bases Voláteis Totais) e perfil microbiológico. Os resultados demonstraram que a combinação de quitosana e goma xantana proporcionaram melhorias na qualidade do pescado refrigerado, uma vez que reduziu as N-BVT, inibiu o crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp e coliformes a 45 °C.

Palavras-chave: filmes; quitosana; goma xantana; hidrolisado; propriedades estruturais; propriedades mecânicas; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

Abstract

Biodegradable films have aroused the interest of the scientific community for presenting potential as packaging materials. They improve quality and reduce food waste, as well as cooperate with the preservation of the environment. In this sense, the general objective of this research was to evaluate chitosan based films combined with xanthan gum and enzymatic protein from croaker (*Micropogonias furnieri*). Thus, this work contemplates four chapters. In the first study, enzymatic hydrolysates of croaker (*Micropogonias furnieri*) were evaluated through the proximal composition, degree of hydrolysis, antioxidant activity, molar mass distribution profile and amino acid composition. Croaker fillets were hydrolyzed with the enzyme Alcalase 2.4L varying only the time, thus, hydrolysates with 2, 4 and 8 h of reaction were obtained. The hydrolyzate protein content varied from 78.28-82.30%, the hydrolyzate with the highest hydrolysis time showed a higher degree of hydrolysis (32.1%) and a higher oxidation inhibition power by the ABTS and DPPH methods (98.35% and 54.11%, respectively). In the second study, films based on chitosan and xanthan gum were elaborated. The films were evaluated by their functional groups, structural, thermal, morphological, physical, mechanical, optical and barrier properties. All films showed endothermic peaks in the range of 122-175 °C and wide exothermic peaks above 200 °C, which were attributed to melt in temperature and thermal decomposition, respectively. These results demonstrated that films with xanthan gum have the highest T_m and $\Delta_m H$. Films containing higher xanthan gum content also show higher tensile strength and lower elongation. The addition of xanthan gum did not affect the water vapor permeability, water solubility and moisture of the films. In the third study, films based on chitosan, xanthan gum and protein hydrolysate of croaker (*Micropogonias furnieri*) were elaborated with the objective of evaluating its antioxidant, mechanical, physical, structural, morphological, thermal, optical and barrier properties. The mixture of xanthan gum and hydrolyzate promoted some changes in the chitosan films. The addition of xanthan gum increased the tensile strength and altered the color parameters of the films. Croaker protein hydrolyzate addition gave significant antioxidant activity to the films, however, higher concentrations tend to increase humidity and decrease their resistance. All the films presented a homogeneous structure, without separation of phases and free of cracks. No significant differences were observed regarding the solubility and permeability to water vapor in the studied films. The fourth study aimed to evaluate the efficiency of chitosan and xanthan gum films in the conservation of croaker steaks kept under refrigeration for 9 days. Proximal composition, loss of mass, color, pH, N-BVT (Total Volatile Bases) and microbiological profile were evaluated. The results demonstrated that the combination of chitosan and xanthan gum provided improvements in the quality of refrigerated fish as it reduced N-BVT, inhibited growth of coagulase-positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp and coliforms at 45 °C.

Keywords: films; chitosan; xanthan gum; hydrolyzate; structural properties; mechanical properties; antioxidant activity; antimicrobial activity.

Lista de Figuras

Figura 1. Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	17
Figura 2. Mecanismo da oxidação lipídica	23
Figura 3. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.....	24
Figura 4. Principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos.....	25
Figura 5. Estrutura química da quitosana.....	28
Figura 6. Estrutura química da goma xantana.....	30
Figura 7. Perfil da distribuição de massa molecular dos hidrolisados de corvina. A: Extração em meio não desnaturante (2,0% SDS); B: Extração em meio desnaturante (2,0% SDS e 1% mercaptoetanol).....	40
Figura 8. Espectros de infravermelho dos filmes e polímeros puros (A); Região expandida dos espectros entre 1800 e 1450 cm ⁻¹ (B). Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f).	53
Figura 9. Difractogramas de raios-X dos filmes Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Os difractogramas de polímeros puros estão dentro da caixa.	54
Figura 10. Termogramas dos filmes Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Os termogramas dos polímeros puros estão dentro da caixa.	57
Figura 11. Micrografias da superfície dos filmes: Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Micrografias de quitosana em pó (g) e goma xantana em pó (h).	59
Figura 12. Espectros infravermelho dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e). ...	75
Figura 13. Termogramas dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e). Dentro da caixa estão os termogramas dos polímeros puros.	77
Figura 14. Difractogramas de raios-X dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e)	79
Figura 15. Micrografias da seção transversal dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e).....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química (base seca) dos hidrolisados proteicos de corvina obtidos com diferentes tempos de reação.....	37
Tabela 2. Grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos obtidos do músculo de corvina com diferentes tempos de reação.	38
Tabela 3. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos do músculo de corvina com diferentes tempos de reação.....	40
Tabela 4. Composição de aminoácidos dos hidrolisados de músculo de corvina.....	41
Tabela 5. Propriedades térmicas dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana e de polímeros puros.....	56
Tabela 6. Teor de umidade, solubilidade em água e em ácido dos filmes de quitosana e goma xantana.....	60
Tabela 7. Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana.....	62
Tabela 8. Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana.	63
Tabela 9. Teor de umidade, solubilidade em água e espessura dos filmes à base de quitosana goma xantana e hidrolisado proteico.	81
Tabela 10. Parâmetros de cor e opacidade dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de corvina.	82
Tabela 11. Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico.	84
Tabela 12. Atividade antioxidante dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado enzimático obtida pelos métodos de ABTS e DPPH.....	86
Tabela 13. Valores de perda de massa dos filés de corvina embalados sem e com revestimentos à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.....	94
Tabela 14. Variação do pH dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.	95
Tabela 15. Cor dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.	97
Tabela 16. Valores de N-BVT dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.	99

Tabela 17. Número Mais Provável (MNP) de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C.....	100
Tabela 18. Quantificação de <i>S. Aureus</i> e detecção de <i>Salmonella</i> dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C.....	101

Sumário

1 Introdução	12
1.1 Hipótese	13
1.2 Objetivos	13
1.2.1 Objetivo geral.....	13
1.2.2 Objetivos específicos	13
2 Revisão de literatura	15
2.1 Produção e consumo de pescado	15
2.2 Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	16
2.3 Proteína do pescado	17
2.3.1 Hidrolisado proteico de pescado.....	18
2.4 Rancificação oxidativa em alimentos	22
2.5 Antioxidantes	24
2.6 Filmes biodegradáveis	25
2.6.1 Filmes proteicos.....	27
2.6.2 Filmes de quitosana.....	28
2.6.3 Filmes de goma xantana.....	29
3 Capítulo 1 - Hidrolisados proteicos de corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>): composição química, distribuição de peso molecular, atividade antioxidante e perfil de aminoácidos	31
3.1 Introdução	32
3.2 Material e métodos.....	33
3.2.1 Material	33
3.2.2 Obtenção dos hidrolisados proteicos	33
3.2.3 Composição proximal	34
3.2.4 Grau de hidrólise (GH).....	34
3.2.5 Atividade antioxidante	34
3.2.6 Perfil de distribuição da massa molar dos hidrolisados	35
3.2.7 Perfil de aminoácidos dos hidrolisados.....	35
3.2.8 Análise estatística	35
3.3 Resultados e discussão.....	36
3.3.1 Composição química	36
3.3.2 Grau de hidrólise (GH).....	37
3.3.3 Atividade antioxidante dos hidrolisados	39

3.3.4 Perfil de distribuição da massa molar dos hidrolisados	40
3.3.5 Perfil de aminoácidos dos hidrolisados.....	41
3.4 Conclusão	42
4 Capítulo 2 - Propriedades estruturais, térmicas, físicas, mecânicas e de barreira de filmes de quitosana adicionado de goma xantana.....	44
4.1 Introdução	45
4.2 Material e métodos.....	46
4.2.1 Material	46
4.2.2 Elaboração dos filmes.....	47
4.2.3 Caracterização dos filmes.....	47
4.2.4 Análise estatística	51
4.3 Resultados e discussão.....	51
4.3.1 pH precursor	51
4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho dos filmes	52
4.3.3 Padrão de difração de raios-X	53
4.3.4 Propriedades térmicas e termogravimétricas dos filmes.....	55
4.3.5 Morfologia dos filmes	58
4.3.6 Teor de umidade, solubilidade em água e em ácido dos filmes	60
4.3.7 Parâmetros de cor e opacidade dos filmes	61
4.3.8 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água	62
4.4 Conclusão	64
5 Capítulo 3 - Filmes biodegradáveis à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de pescado.....	66
5.1 Introdução	67
5.2 Material e métodos.....	68
5.2.1 Material	68
5.2.2 Preparação do hidrolisado proteico de corvina	68
5.2.3 Caracterização dos hidrolisados	69
5.2.4 Elaboração dos filmes.....	70
5.2.5 Caracterização dos filmes.....	71
5.3 Resultados e discussão.....	74
5.3.1 Caracterização do hidrolisado proteico de corvina	74
5.3.2 Grupos Funcionais.....	74
5.3.3 Propriedades termogravimétricas dos filmes	76
5.3.4 Padrão de difração de raios-X	78

5.3.5 Morfologia dos filmes	79
5.3.6 Teor de umidade, solubilidade em água e espessura dos filmes	81
5.3.7 Parâmetros de cor e opacidade dos filmes	82
5.3.8 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água dos filmes	83
5.3.9 Atividade antioxidante dos filmes adicionados de hidrolisado	85
5.4 Conclusão	87
6 Capítulo 4 - Aplicação de filmes à base de quitosana e goma xantana na conservação de filés de pescado refrigerado	88
6.1 Introdução	89
6.2 Material e métodos	90
6.2.1 Material	90
6.2.2 Elaboração dos filmes e preparação das amostras	90
6.2.3 Caracterização dos filés	91
6.3 Resultados e discussão	93
6.3.1 Composição proximal	93
6.3.2 Perda de massa	93
6.3.3 Potencial hidrogeniônico (pH)	94
6.3.4 Cor dos filés de corvina	96
6.3.5 Determinação de N-BVT (Bases Voláteis Totais)	98
6.3.6 Análises microbiológicas	100
6.4 Conclusão	103
Referências bibliográficas	104

1 Introdução

Os peixes são alimentos altamente perecíveis por apresentarem algumas características, tais como, alto teor de água, menor proporção de tecido conjuntivo, alto teor de enzimas autolíticas, menor queda do pH após a morte e elevada microbiota. Essas peculiaridades propiciam uma rápida deterioração do pescado, sendo esta a responsável por grandes perdas durante o armazenamento *post-mortem*. Diante disso, uma das maneiras de prolongar a vida útil de pescado é aplicar métodos de conservação adequados. Nesse sentido, os filmes biodegradáveis combinados com refrigeração vêm se destacando por promoverem melhorias na qualidade de alimentos, uma vez que os protege da deterioração biológica, física e química, resultando em uma vida de prateleira prolongada e segura. E por também minimizarem o impacto ambiental, decorrente da utilização de embalagens derivadas de petróleo.

Os materiais de revestimento para produtos alimentares podem ser de diferentes fontes de biomateriais, dentre elas, amido, celulose, alginato, gomas, pectina, quitosana, proteínas, como caseína, zeína, glúten, queratina, albumina e ceras (DIÉGUEZ et al., 2015). Dentre esses materiais, a quitosana tem se mostrado promissora, por apresentar propriedades tecnológicas adequadas, como comestibilidade e não-toxicidade, propriedades antimicrobianas, permeabilidade seletiva de gases (CO_2 e O_2), translucidez e brilho, biodegradabilidade e baixo custo (ELSABEE e ABDOL, 2013). Contudo, filmes feitos com um único material podem não satisfazer as propriedades requeridas para o ótimo desempenho funcional dos filmes. Desta forma, a associação de diferentes polímeros com outros aditivos considerados seguros para alimentos, pode melhorar as propriedades dos filmes (WEI et al., 2015).

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina, obtida pela desacetilação parcial da quitina, adquirida a partir dos exoesqueletos de crustáceos (YOUSSEF et al., 2015).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzido pela fermentação aeróbica submersa de culturas do gênero *Xanthomonas*. É constituída por repetidas unidades pentassacarídicas, formadas por duas unidades de β -D-

glicose unidas por ligação 1-4, formando a cadeia principal; e β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico 1,2- α -D-manose na cadeia lateral (FITZPATRICK et al., 2013).

Os hidrolisados proteicos são produtos resultantes da clivagem de proteínas em peptídeos de diversos tamanhos, obtidos através de processos químicos ou enzimáticos. Os peptídeos bioativos são sequências curtas de aproximadamente 3-20 aminoácidos que possuem importantes atividades biológicas, tais como anti-hipertensiva, imunomoduladora, antitrombótica, antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana (DI BERNARDINI et al., 2011; VERCRUYSSSE et al., 2005). Uma série de estudos demonstrou que os hidrolisados proteicos de pescado são fontes potenciais de peptídeos antioxidantes (BOUGATEF et al., 2010; YOU et al., 2010). You et al. (2010) relataram que os peptídeos antioxidantes possuem atividade quelante de metal, capacidade de doar elétrons ou hidrogênios, o que permite a eles interagirem com os radicais livres, evitando ou finalizando as reações em cadeias. Diante do exposto, considera-se importante investigar novos materiais para embalagens, baseados em biopolímeros de fontes renováveis que apresentem propriedades funcionais, promovendo a extensão da vida útil de alimentos.

1.1 Hipótese

Filmes à base de quitosana incorporados de goma xantana e hidrolisado enzimático de corvina (*Micropogonias furnieri*) melhoram a qualidade e estendem a vida útil do pescado refrigerado.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar filmes à base de quitosana combinado de goma xantana e hidrolisado proteico de corvina para conservação de pescado refrigerado.

1.2.2 Objetivos específicos

Produzir hidrolisados proteicos a partir de músculo de corvina (*Micropogonias furnieri*) utilizando enzima Alcalase.

Caracterizar os hidrolisados enzimáticos de pescado quanto ao grau de hidrólise, composição proximal, atividade antioxidante, perfil de distribuição da massa molar e perfil de aminoácidos.

Desenvolver filmes de quitosana adicionados de goma xantana e verificar suas propriedades mecânicas, físicas, químicas, térmicas morfológicas, estruturais, ópticas e de barreiras.

Selecionar filmes de quitosana adicionados de goma xantana com melhores desempenhos (melhores propriedades mecânicas e de barreira), reproduzi-los com a adição de hidrolisado enzimático, avaliar a atividade antioxidante e reavaliar suas propriedades mecânicas, físicas, químicas e de barreira.

Com os filmes de melhor resposta (propriedades mecânicas, físicas, químicas e de barreira), produzir embalagens e avaliar sua eficiência na conservação de corvina refrigerada.

2 Revisão de literatura

2.1 Produção e consumo de pescado

A produção mundial de pescado alavancou nas últimas décadas. Em 2014 foram produzidas 167,2 milhões de toneladas, sendo 55,8% deste total proveniente da pesca extrativa. Os maiores produtores de pesca extrativa marinha foram a China com aproximadamente 14,8 milhões de toneladas, a Indonésia com 6,02 milhões de toneladas, Estados Unidos da América com 4,95 milhões de toneladas e Rússia com cerca de 4,09 milhões de toneladas (FAO, 2016).

O Brasil produziu 1.431.974,4 toneladas de pescado no ano de 2011, sendo a pesca extrativa marinha a principal fonte de produção com 38,7% do total de pescado, seguida pela aquicultura continental (38,0%), pesca extrativa continental (17,4%) e aquicultura marinha (~6%). A região Nordeste apresentou a maior produção de pescado do país, com 454.216,9 t (31,7%), logo depois vêm as regiões Sul com 336.451,5 t (23,5%), Norte 326.128,3 t (22,8%), Sudeste 226.233,2 t (15,8%) e Centro-Oeste 88.944,5 t (6,2%), porém o estado da Federação que registrou maior produção de pescado foi Santa Catarina com 194.866,6 t (13,6%), continuado pelos estados do Pará com 153.332,3 t (10,7%) e Maranhão com 102.868,2 t (7,2%) (BRASIL, 2011).

No setor de pesca e aquicultura o Brasil é considerado um país privilegiado naturalmente por possuir uma extensa costa marítima de 8.400 km e um dos maiores reservatórios de água doce do mundo, além da disponibilidade de recursos hídricos, mão de obra disponível, clima favorável e crescente demanda do mercado interno (SIDONIO et al., 2012; SEAP, 2007).

O Rio Grande do Sul ocupa o oitavo lugar no *ranking* nacional de volume de produção de pescado, com 63.717,6 t de pescado (BRASIL, 2011). A Laguna ou Lagoa dos Patos é a região onde se localizam as principais pescarias estuarinas e marinhas do Rio Grande do Sul, possui cerca de 10.000 km² de área. Em razão de sua extensão é enunciada como a maior lagoa do tipo estrangulado do mundo, medrando-se de 30°30'S a 32°12'S, próximo da cidade de Rio Grande, onde a lagoa se liga com o oceano Atlântico (KALIKOSKI e VASCONCELLOS, 2013).

Na Lagoa dos Patos, as principais espécies capturadas são corvina (*Micropogonias furnieri*), bagre (*Netuma barba*), tainha (*Mugil platanus*), pescadinha

real (*Macrodon ancylodon*) e castanha (*Umbrina canosai*) (MARTINS e RENNER, 2014).

Atualmente, os consumidores vêm se mostrando mais preocupados com alimentação e saúde. Em razão disso, observou-se um aumento do consumo de produtos da pesca, visto que o pescado oferece benefícios à saúde por apresentar excelente fonte de macronutrientes e micronutrientes (BANDARRA et al., 2004). O consumo mundial de pescado *per capita* aumentou de 9,9 kg para 20,1 kg em 2016, representando um incremento de mais de 50% em relação ao ano de 1960. Vários fatores têm contribuído com esse crescimento, dentre eles o crescimento demográfico e urbanização (FAO, 2016). Um levantamento feito pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013) apontou que os brasileiros estão consumindo mais pescado, 17,3 kg de pescado *per capita*/ano, quantidade superior à média mundial recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é de 17 kg *per capita*/ano (FAO, 2010).

2.2 Corvina (*Micropogonias furnieri*)

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é uma espécie marinha pertencente à família *Sciaenidae* e é encontrada desde a Península de Yucatán (Golfo do México 20°N) até o Golfo de San Matias (Argentina, 41°S). No Brasil, esta espécie é bastante explorada, sendo encontrada com abundância no sul e sudeste do país (HAIMOVICI et al., 2016). A corvina possui algumas peculiaridades que a distingue de outras espécies, tais como a longevidade e aptidão de sobrevivência nas mais adversas condições. Geralmente é encontrada em lugares ricos em alimentos como fundos lodosos e arenosos de águas costeiras ou estuários, alimenta-se de organismos bentônicos, crustáceos, moluscos e ocasionalmente captura peixes. Normalmente vive agrupada em cardumes e se reproduz em épocas distintas ao longo da costa, possivelmente devido às diferentes condições ambientais, como temperatura da água e a disponibilidade de alimentos (ISAAC, 1988; GALLI et al., 2016).

Nas águas riograndenses, a corvina (Figura 1) é comumente encontrada na região estuarina (Lagoa dos Patos, Lagoa Mirim e outras lagunas do litoral gaúcho), além do oceano. Pode ser capturada durante todo ano, mais intensamente entre os meses de outubro e janeiro (HAIMOVICI e UMPIERRE, 1996; BRAVERMAN et al.,

2009). No ano de 2011, a corvina (*Micropogonias furnieri*) foi a segunda espécie mais capturada com 43.369,7 t (BRASIL, 2011). Apesar do grande volume disponível no mercado, esta espécie apresenta algumas restrições que afeta a sua valorização comercial, como baixo rendimento em músculo e a susceptibilidade a apresentar parasitas (ZAVAREZE, 2012).

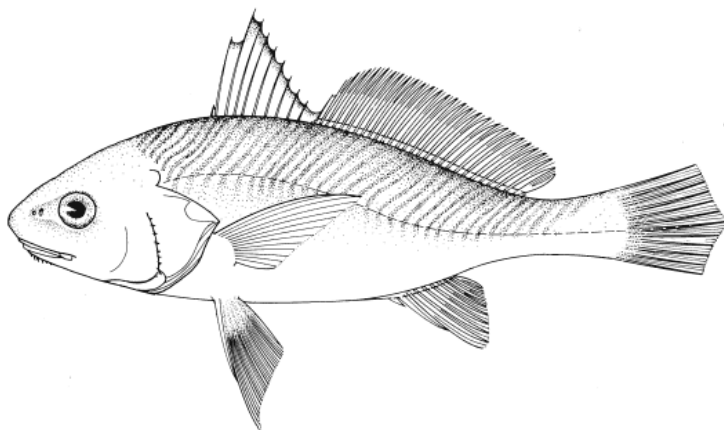


Figura 1. Corvina (*Micropogonias furnieri*)

Fonte: ISAAC (1988).

Como a maioria dos pescados, a corvina também é uma excelente fonte de proteína, ácido graxo insaturado, vitaminas e minerais. Todavia, a composição proximal deste peixe pode ser influenciada por fatores exógenos e endógenos (AMORIM et al., 2016). Badolato et al. (1994) citam que a composição química da corvina pode variar de 77,2 a 83,8% de umidade, 14,5 a 20,7% de proteína, 0,8 a 1% de lipídios e 1,0 a 1,2% de cinzas. Zavareze (2012), ao estudar a composição química do músculo de corvina, encontrou os seguintes resultados: 81,7% de umidade, 16,5% de proteínas, 0,6% de cinzas e 0,5% de lipídios.

2.3 Proteína do pescado

A proteína do pescado se destaca por apresentar alto valor nutritivo, com um balanceamento de aminoácidos essenciais compatível à proteína padrão da FAO (1973), no entanto, a composição proteica da carne do pescado pode variar em função de alguns fatores como espécie, sexo, idade, alimentação e época do ano. Geralmente o músculo de pescado contém cerca de 20% de proteínas (OGAWA,

1999; LISTRAT et al., 2016). As proteínas musculares do pescado podem ser classificadas em vários grupos: proteínas miofibrilares (proteínas contrácteis), proteínas sarcoplasmáticas (proteínas metabólicas) e estroma (proteínas do tecido conectivo) (NEHETE et al., 2013).

Proteínas sarcoplasmáticas do músculo do pescado representam em torno de 20 a 30% do total de proteínas, são solúveis em água ou em soluções salinas fracas, e sua importância reside em que a maioria tem atividade enzimática. Normalmente, as proteínas sarcoplasmáticas do pescado apresentam massa molar média inferior à dos mamíferos (ORDÓÑEZ, 2005; YU et al., 2017).

As proteínas miofibrilares constituem 66 a 77% das proteínas totais do músculo de pescado, tendo um papel importante na coagulação e formação de gel quando se processa o músculo de pescado (OGAWA e MAIA, 1999; CERCEL et al., 2015). São consideradas as principais proteínas do pescado e estão contidas nas células musculares, tendo como função a formação dos tecidos esqueléticos, além de serem responsáveis pelo fenômeno de contração muscular (BOBBIO e BOBBIO, 2001). Influenciam também na capacidade de retenção de água, nas propriedades emulsificantes e na maciez da carne (LIU et al., 2017). As proteínas miofibrilares incluem proteínas contrácteis, como a miosina e a actina, responsáveis pela contração muscular; proteínas reguladoras, como a tropomiosina e a troponina; proteínas microrreguladoras como a α -actina e proteínas de suporte, como a conectina (LISTRAT et al., 2016).

Proteínas do estroma incluem as proteínas do tecido conectivo, sendo o colágeno e elastina as proteínas majoritárias, responsáveis pela firmeza da carne (YU et al., 2017). Contudo, sua quantidade pode oscilar de 3% para gadídeos a 10% para elasmobrânquios (ORDÓÑEZ, 2005). Estas proteínas são insolúveis em água, soluções salinas ou alcalinas.

2.3.1 Hidrolisado proteico de pescado

Os hidrolisados proteicos de pescado são concentrados com excelentes propriedades funcionais, contendo cerca de 90% de proteínas (CHALAMAIAH et al., 2012). Podem ser definidos como proteínas que são clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos (BENITEZ et al., 2008; SBROGGIO et al., 2016). Ghribi et al. (2015) citam que os hidrolisados possuem

propriedades moleculares distintas das proteínas de origem, visto que este processo conduz à diminuição da massa molecular, o aumento do número de grupos ionizáveis e à exposição de grupos hidrofóbicos e dos aminoácidos das cadeias laterais.

Os hidrolisados proteicos de pescado podem ser obtidos por métodos químicos ou biológicos. Na prática industrial, a hidrólise química é mais utilizada devido o processo apresentar menor custo, já a hidrólise enzimática é um método mais promitente quando se deseja obter produtos com melhor qualidade. Neste processo, enzimas proteolíticas são utilizadas com a finalidade de solubilizar as proteínas do pescado (FERNANDES et al., 2016). A hidrólise enzimática possui distintas vantagens sobre os demais métodos de hidrólise, tais como, especificidade de ação de enzima; digestão sob condições moderadas; controle do grau de hidrólise; taxa de hidrólise controlada através de inativação térmica da enzimas; propriedades funcionais atrativas; dispersibilidade; nenhuma destruição dos aminoácidos; disponibilidade comercial em larga escala; custo moderado; menor teor de sal ao produto final e formação mínima de subproduto (LIRA, 2010; AMORIM et al., 2016).

O grau de hidrólise é um parâmetro importante que reflete na classificação e aplicação dos hidrolisados. Assim, os hidrolisados agrupam-se em três classes: baixo grau de hidrólise (<10%), para melhoria das propriedades funcionais; grau de hidrólise variável, para a utilização como aromatizantes; altamente hidrolisados (>10%), utilizados em alimentos para fins especiais (VIOQUE et al., 2006). O grau de hidrólise é definido como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas em relação a proteína original e é determinado pelas condições utilizadas, sendo estas a concentração de substrato, a relação enzima/substrato, o tempo de incubação e as condições físico-químicas como o pH e a temperatura. Outro fator determinante no grau de hidrólise é a natureza da enzima, caracterizada por sua atividade específica e tipo de atividade. Assim, a natureza da enzima usada não só vai influenciar no grau de hidrólise, mas também no tipo de peptídeos produzidos (BENÍTEZ et al., 2008; MUNE, 2015). Portanto, para se obter hidrolisados com alta qualidade é fundamental o controle das condições hidrolíticas (OLIVEIRA et al., 2015).

Alguns autores relatam que as proteínas de pescados apresentam viabilidade a esse processo por possuir todos os aminoácidos essenciais em qualidade e quantidade adequada e alta sensibilidade à hidrólise; além disso, alcança

digestibilidade superior a 95%, maior que da carne bovina e do leite (NISANG et al., 2005). Outra vantagem de hidrolisar pescado é o aproveitamento de espécies de baixo valor comercial (PRABHA et al., 2016).

As enzimas proteolíticas são fundamentais nos processos hidrolíticos, uma vez que atuam na quebra de ligações peptídicas da cadeia proteica e, dependendo da sua especificidade, podem afetar o tamanho, a quantidade, a composição de aminoácidos livres, peptídeos e na sequência de aminoácidos que a compõem (WU et al., 2003; KARAMACÍ et al., 2016). De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), as enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam (hidrolases, ligases, oxidoredutases, transferases, liases e isomerases). As enzimas proteolíticas ou proteases são designadas como hidrolases (utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas), pertencem a classe 3 e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As enzimas da subclasse EC 3.4 são classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99). Esses grupos referem-se à capacidade das enzimas em clivar ligações peptídicas nas extremidades ou no interior da cadeia polipeptídica, respectivamente (KOBELITZ, 2008).

As enzimas endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas, atuando preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. Já as exopeptidases, atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, formando as aminopeptidases, ou carboxipeptidases. Em proteínas alimentares, geralmente utilizam-se as endoproteínases, podendo também estar combinadas com as exoproteínases para que ocorra a degradação completa (RAO et al., 1998).

A alcalase é uma endopeptidase bacteriana alcalina, produzida a partir da fermentação submersa do *Bacillus licheniformis*. Na literatura tem-se aprovado amiúde que a alcalase é uma das melhores enzimas para a hidrólise de proteínas de peixe (KRISTINSSON e RASCO, 2000; MUZAIFA et al., 2012). Por esta razão, tem sido extensivamente utilizada por vários investigadores (FALLAH et al., 2015).

2.3.1.1 Propriedades biológicas dos hidrolisados proteicos de pescado

Há evidências científicas de que aminoácidos, peptídeos e proteínas provenientes dos alimentos podem trazer benefícios à saúde (MÖLLER et al., 2008; SLIZYTE et al., 2016). Je et al. (2007) reportaram que os peptídeos com propriedades biológicas são frações peptídicas constituídas de 3 a 20 resíduos de aminoácidos, e a sua bioatividade depende da sequência e composição de aminoácidos. Essas biomoléculas encontram-se inativas dentro da sequência de proteínas e são liberadas durante o processo digestório ou durante o processamento alimentar. Uma vez liberadas, exercem diversas funções fisiológicas, como atividade opióide, imunorreguladora, antiúlcera, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (LEE et al., 2010; MAGAÑA et al., 2015). Além disso, vários peptídeos têm mostrado propriedades multifuncionais (MEISEL e FITZGERALD, 2003). Atualmente, os hidrolisados de proteína de peixe são considerados uma importante fonte de proteína e peptídeos bioativos.

2.3.1.2 Peptídeos antioxidantes de pescado

Diante do crescente interesse em encontrar antioxidantes provenientes de fontes naturais que podem ter menos risco potencial que os sintéticos, pesquisas sobre hidrolisados de proteína de pescado que exercem atividade antioxidante vem despertando interesse do meio acadêmico (GIRGIH et al., 2015). Ultimamente, uma série de estudos demonstrou que os hidrolisados proteicos derivados de proteínas de peixe são fontes potenciais de peptídeos antioxidantes (GARCÍA-MORENO et al., 2014; SLIZYTE et al., 2016).

Durante a hidrólise, a clivagem da ligação peptídica permite a liberação de peptídeos ativos capazes de sequestrar radicais de oxigênio, quelar íons metálicos pró-oxidantes e inibir a peroxidação lipídica em sistemas alimentares (YOU et al., 2010). A seleção de enzima proteolítica apropriada é um fator importante para a liberação de peptídeos antioxidantes a partir de proteínas de peixe. As enzimas proteolíticas, tais como a alcalase, α -quimotripsina, neutrase, papaína, pepsina, tripsina, pancreatina, flavourzyme, bromelina, pronase E, protamex, orientase, termolisina, validase, tem sido testados com sucesso para a produção de peptídeos antioxidantes obtidos a partir de proteínas de peixe (NAKAJIMA et al., 2009; LI et al., 2016).

Os peptídeos antioxidantes de proteínas de peixe são considerados moléculas seguras e saudáveis com baixa massa molecular, absorção fácil, baixo custo e alta atividade (BERNARDI et al., 2016). As propriedades antioxidantes dos peptídeos de pescado estão intimamente relacionadas a composição de aminoácidos, sequência e hidrofobicidade (BOUGATEF et al., 2010). A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de pescado tem sido relatada por diversos autores, para tilápia (BERNARDI et al., 2016), bacalhau (*Gadus morhua*) (GIRGIH et al., 2015), sardinha (*Sardinella aurita*) (BOUGATEF et al., 2010), escamudo (*Pollachius virens*) (CHABEAUD et al., 2009), linguado albacora (*Limanda aspera*) (JUN et al., 2004) e cavala (*Scomber austriasicus*) (WU et al., 2003). No entanto, há pouca informação sobre a produção de hidrolisados de proteína de peixe com atividade antioxidante da espécie *Micropogonias furnieri*.

2.4 Rancificação oxidativa em alimentos

A rancificação oxidativa em alimentos é um grande desafio para os fabricantes de alimentos, uma vez que reduz a vida útil e altera a qualidade e o valor nutricional, além de comprometer a integridade e segurança dos alimentos através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (SENANAYAKE, 2013). A oxidação lipídica é considerada um fenômeno químico bastante complexo que envolve reações radicalares capazes de se auto-propagar. Seus mecanismos dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH) (ORDÓÑES, 2005).

As reações de oxidação em lipídios são causadas pelo oxigênio atmosférico, ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes, sendo o oxigênio atmosférico o mais frequente. As reações de oxidação ocorrem quando elétrons são removidos de um átomo ou grupo de átomos. Para cada reação de oxidação há uma reação de redução correspondente envolvendo a adição de elétrons a um átomo ou grupo de átomos (ARAÚJO, 2008).

As espécies reativas de oxigênio dividem-se em radicais livres e não radicais. Os radicais livres são: radical hidroxila (OH^\bullet), radical nítrico (N^\bulletO), radical superóxido (O_2^\bullet), radical peroxila (ROO^\bullet) radical alcóxila (RO^\bullet); não radicais são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ozônio (O_3) (COMBS, 1998). Senanayake (2013) menciona que a oxidação lipídica é

uma reação em cadeia de radicais livres que prossegue através de três fases distintas: iniciação, propagação e terminação. O mecanismo da oxidação lipídica está descrito na Figura 2.

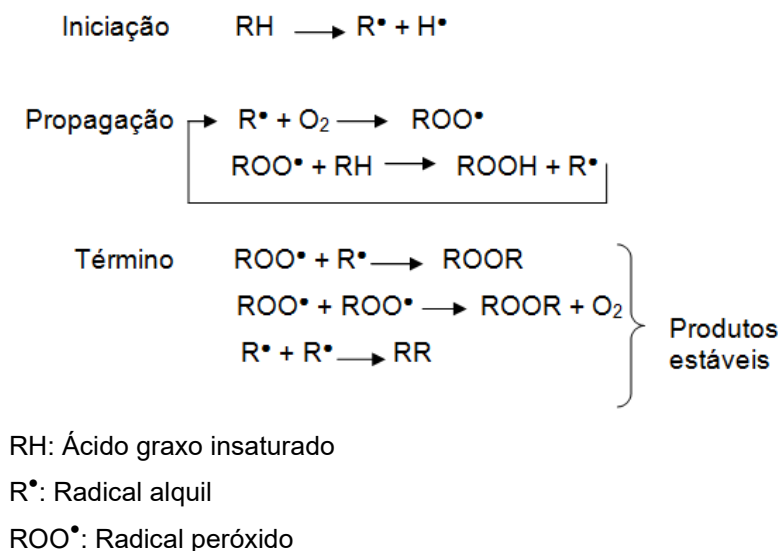


Figura 2. Mecanismo da oxidação lipídica

Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

- Iniciação – Esta etapa envolve a captação de hidrogênio a partir de um ácido graxo insaturado (RH) na presença de um iniciador (agente físico, químico) que resulta na formação de um radical alquila (R^{\bullet}), como mostrado acima (LAGUERRE et al., 2007).

- Propagação – nesta fase ocorre a reação do radical livre com o oxigênio atmosférico para formar um radical peróxido (ROO^{\bullet}). O radical peróxido reage com outro ácido graxo insaturado para formar um novo radical livre. Os radicais livres provenientes desta reação atuam como propagadores, resultando em um processo autocatalítico (AANEBY, 2012).

- Término – nesta última etapa, o processo de oxidação prossegue com a transformação de hidroperóxidos em compostos de oxidação secundários não radicais livres. O principal mecanismo de decomposição de hidroperóxido envolve a cisão da dupla ligação adjacente ao grupo hidroperóxido, conduzindo à formação de compostos voláteis e não voláteis, tais como, hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois e cetonas voláteis, aldeídos não voláteis, triacilgliceróis oxidados, dentre outros. O tipo de subproduto obtido após a oxidação dos ácidos graxos é determinado pela

composição de hidroperóxido e pelo tipo de cisão homolítica de ligações duplas na cadeia de ácido graxo (MCCLEMENTS, 2014).

Para evitar ou atrasar o processo de oxidação lipídica em alimentos é necessário controlar os fatores que favorecem essa reação (temperatura, luz, presença de metais, dentre outros). Outra maneira de conter a oxidação lipídica é bloquear a formação de radicais livres por meio da adição de antioxidantes (LAGUERRE et al., 2007).

2.5 Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas em alimentos (BRASIL, 1997). Podem ser classificados em produtos que atuam sobre a formação de $^1\text{O}_2$ ou que reagem com $^1\text{O}_2$ ou ainda, em produtos que atuam de forma competitiva em cadeia ou que atuam sobre os peróxidos, decompondo-os de forma a produzirem compostos estáveis que não mais participam da reação em cadeia de radicais livres (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

O mecanismo funcional dos antioxidantes tem sido foco de estudo de vários pesquisadores. De acordo com Bailey (1996) e Martins (2010), os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes primários (sintéticos), sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes/sequestrantes e mistos. Os principais antioxidantes sintéticos utilizados em produtos alimentares são compostos fenólicos, como butil-hidroxi-anisol - BHA (2-terc-butil-4-metoxifenol), butil-hidroxi-tolueno - BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), terc-butil-hidroquinona - TBHQ (2-terc-butilbenzeno-1,4-diol) e propil galato - PG (propil 3,4,5-trihidroxibenzoato). A estrutura fenólica desses compostos é responsável pela doação de um hidrogênio ao radical livre e, por conseguinte, a interrupção do mecanismo de oxidação por radicais livres pela formação de espécies estabilizadoras (BORSATO et al., 2014). O mecanismo de ação dos antioxidantes primários está representado pela Figura 3.

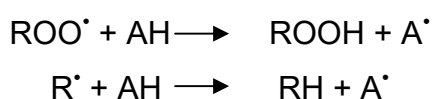


Figura 3. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários

Onde, ROO^\bullet e R^\bullet são radicais livres; AH antioxidante como um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet radicais estabilizados.

Fonte: Frankel (1980).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (BOBBIO e BOBBIO, 2001). As estruturas químicas dos principais antioxidantes sintéticos utilizados em produtos alimentícios estão representadas na Figura 4.

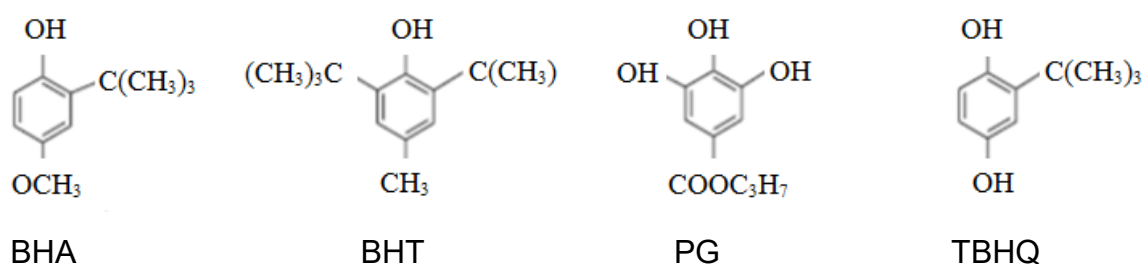


Figura 4. Principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos

Fonte: RAMALHO e JORGE (2006).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos, principalmente dos anos 80 e 90, que apontam antioxidantes sintéticos como causadores de riscos potenciais para a saúde (MUT-SALUD et al., 2015). Wurtzen (1993), ao investigar o efeito do BHA em roedores, constatou o desenvolvimento de tumores no estômago desses animais. Sherwin (1995), relata que o BHT pode provocar alterações hemorrágicas e hiperplasia dos pneumócitos em ratos a longo prazo. Witschi (1986) também observou efeitos do BHT e BHA sobre o fígado de ratos.

Estudos contraditórios foram reportados por outros pesquisadores, Kahl et al. (1993) citam que os efeitos tóxicos produzidos pelo BHA e BHT ocorrem apenas em doses elevadas em tratamentos longos. Carocho e Ferreira (2013) afirmaram que ingestões diárias de 0,25 mg/kg/dia para o BHA e 1,0 mg/kg/dia para o BHT, são seguras. Diante das controvérsias sobre a ingestão desses aditivos, os antioxidantes provenientes de fontes naturais, como os hidrolisados proteicos vem ganhando interesse da comunidade científica por serem considerados eficientes e seguros.

2.6 Filmes biodegradáveis

Atualmente, tem havido um interesse expressivo em relação aos polímeros biodegradáveis, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, às preocupações ambientais sobre o descarte dos materiais não renováveis das embalagens convencionais e às oportunidades para criar novos mercados para as matérias-primas formadoras de filme (YOUSSEF et al., 2015).

Os filmes biodegradáveis são produzidos a partir de materiais biológicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados. Devem ser decompostos em ambientes microbiologicamente ativos, levando à formação de compostos mais simples, como água, metano e dióxido de carbono (PORTA et al., 2015).

Chitarra e Chitarra (2005) relataram que os filmes proteicos ou à base de polissacarídeos apresentam propriedades interessantes como as mecânicas e ópticas, no entanto, exibem alta sensibilidade à umidade, pobres propriedades de barreira ao vapor de água. Por outro lado, os filmes elaborados com lipídios e os poliésteres apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor de água, mas são usualmente opacos e poucos flexíveis.

De acordo com Dhanapal et al. (2012), os filmes biodegradáveis são classificados de acordo o tipo de biomolécula usada em sua preparação. Os filmes simples são aqueles elaborados com um tipo de biomolécula; compostos, quando elaborados com dois ou mais tipos de biomoléculas. Vários autores tem mostrado que os filmes compostos possuem melhores propriedades que os filmes simples (WEI et al., 2015; LEUANGSUKRERK et al., 2014).

Denavi et al. (2009) reportam que os principais constituintes para uma boa formação de filmes são polímeros de elevada massa molar, solvente e plastificante, nesse sentido, os filmes necessitam conter substâncias que formem uma matriz resistente e que tenha capacidade de adesão às superfícies dos alimentos. Karbowiak et al. (2008) citam que as interações inter e intramoleculares e ligações cruzadas das cadeias poliméricas são fatores determinantes na formação de filmes.

A obtenção dos filmes pode ser através de uma solução ou dispersão do agente formador de filme, seguido da formação de uma camada fina através de técnicas como *casting*, extrusão, termoformagem, injeção, sopro, entre outras (GALDEANO et al., 2009).

As propriedades e características dos filmes dependem de alguns fatores, como o método e condições utilizadas durante a confecção do filme (pH,

concentração de biopolímero e tratamento térmico da solução), tipo de polímero usado (conformação, massa molecular e distribuição de cargas) e condições ambientais (umidade relativa e temperatura) (CUQ et al., 1996; FERREIRA et al., 2016).

2.6.1 Filmes proteicos

As proteínas são macromoléculas biológicas compostas por monômeros denominados de aminoácidos. Estes monômeros contêm na sua estrutura molecular pelo menos um grupo de amina ($-NH_2$) e um grupo carboxílico ($-COOH$). Além disso, cada aminoácido tem uma cadeia lateral (R) característica que influi nas suas propriedades físico-químicas e, portanto, nas propriedades das proteínas (BOBBIO e BOBBIO, 2003). Tendo em vista o exposto, as proteínas podem ser utilizadas com sucesso nas formulações de embalagens biodegradáveis (RIVERO et al., 2009).

Os filmes à base de proteína apresentam melhores propriedades mecânicas e de barreira em comparação com os filmes preparados a partir de polissacarídeos, em decorrência de sua estrutura, que lhes confere melhores propriedades funcionais (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Isto se deve principalmente por causa da estrutura específica que possuem as proteínas e sua capacidade de formar ligações covalentes intermoleculares e ligações de hidrogênio (SOUSA, 2012).

Biopolímeros à base de proteínas por apresentarem diversas propriedades desejáveis, têm sido extensivamente estudados no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (PÉREZ-MATEOS et al., 2009). No entanto, estes filmes possuem algumas limitações em relação a sua utilização, uma vez que são muito sensíveis à umidade e exibem pobres propriedades de barreira de vapor de água (GÓMEZ-ESTACA et al., 2016). Li et al. (2006) citam que estas restrições podem representar desvantagens quando estes são aplicados em produtos alimentares com elevados teores de umidade, porque os filmes podem inchar, dissolver ou desintegrar-se quando em contato com a água.

As propriedades dos filmes proteicos podem ser influenciadas por vários fatores tais como a fonte proteica, pH da solução de proteína, plastificantes, condições de preparação e de substâncias incorporadas em soluções de formação de película (PRODPRAN et al., 2007). As proteínas de origem animal e vegetal (gelatina, proteínas miofibrilares de pescado, proteínas miofibrilares de carne bovina,

proteínas de soro de leite, glúten, zeína e proteína de soja) são as mais requisitadas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (PLÁCIDO, 2007).

As proteínas de pescado vêm despertando interesse na tecnologia de biofilmes. Zavareze (2012) ao estudar filmes biodegradáveis à base de pescado, observou que as proteínas de peixe exibem algumas propriedades interessantes na elaboração de filmes, como plasticidade, elasticidade, capacidade de formar redes. A mesma autora, ao analisar filés de bagre embalados com filmes de proteína de pescado contendo nanocápsulas de hidrolisado proteico de pescado, constatou redução da oxidação lipídica. Ferreira (2014), ao avaliar filmes nanocompósitos obtidos a partir de proteínas de pescado e nanoargila incorporados com óleos essenciais, verificou atividade antimicrobiana e por conseguinte acréscimo de vida útil. Hu et al. (2013) estudaram músculo de carpa comum revestido com hidrolisado de carpa prateada e quitosana, e verificaram que o revestimento com hidrolisado estendeu a vida útil da carpa comum.

2.6.2 Filmes de quitosana

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Sua estrutura (Figura 5) é formada pela repetição de unidades de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina (ELSABEE e ABDOL, 2013).

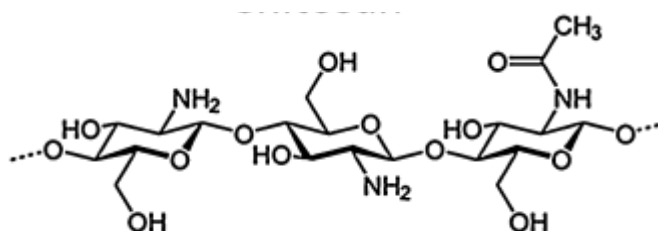


Figura 5. Estrutura química da quitosana

Fonte: Van den Broek et al. (2015)

A solubilidade da quitosana depende do grau de desacetilação, da distribuição dos grupos acetila ao longo da cadeia principal, da massa molecular e da natureza do ácido utilizado para a protonação (PILLAI et al., 2009). A quitosana é solúvel em solução ácida com pH abaixo de 6,0 devido à presença de grupos amino

(LECETA et al., 2013a; SZYMAŃSKA e WINNICKA, 2015). Kim et al. (2017) mencionaram que a solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. Szymańska e Winnicka (2015) reportam que as propriedades da quitosana, tais como pureza, viscosidade, grau de desacetilação, massa molar e estrutura polimorfa, podem variar de acordo com a temperatura, tempo de reação de desacetilação e composição dos reagentes.

A quitosana é um polímero promitente com aplicações em diversos campos (SZYMAŃSKA e WINNICKA, 2015). No setor de filmes e revestimentos comestíveis, a quitosana vem se destacando por apresentar propriedades tecnológicas adequadas quando aplicada em alimentos, tais como biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas, permeabilidade seletiva de gases (CO_2 e O_2), aparência estética desejável, atoxicidade, não-poluinte e baixo custo (ELSABEE e ABDOL, 2013). No entanto, este polímero apresenta algumas limitações como alta permeabilidade ao vapor de água, devido a sua natureza hidrofílica (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; SHARIATINIA e FAZLI, 2015).

Nos últimos anos, misturas de quitosana com polímeros não iônicos e outros compostos receberam muita atenção por apresentarem propriedades físico-químicas melhoradas em comparação com o polímero puro. A fim de melhorar as propriedades de filmes à base de quitosana, numerosos estudos foram relatados com mistura de outros polímeros (BELLINI et al., 2015; SHARIATINIA e FAZLI, 2015). Youssef et al. (2015) verificaram as propriedades mecânicas e antibacterianas de filmes de quitosana/nanocompósitos. Martins et al. (2012) estudaram a influência de α -tocoferol sobre as propriedades físico-químicas de filmes à base de quitosana. Casariego et al. (2009) tentaram melhorar as propriedades de filmes de quitosana usando nanopartículas de argila. Pastor et al. (2013) avaliaram as propriedades físicas e antioxidantes de filmes à base de quitosana e metilcelulose contendo resveratrol.

2.6.3 Filmes de goma xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzido pela fermentação aeróbica submersa de cultura pura do gênero *Xanthomonas*. A goma

xantana é constituída por repetidas unidades pentassacarídicas (Figura 6), sendo duas unidades de β -D-glicose unidas por ligação 1-4 formando a cadeia principal; a cadeia lateral é composta de β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico-1,2- α -D-manose (FITZPATRICK et al., 2013).

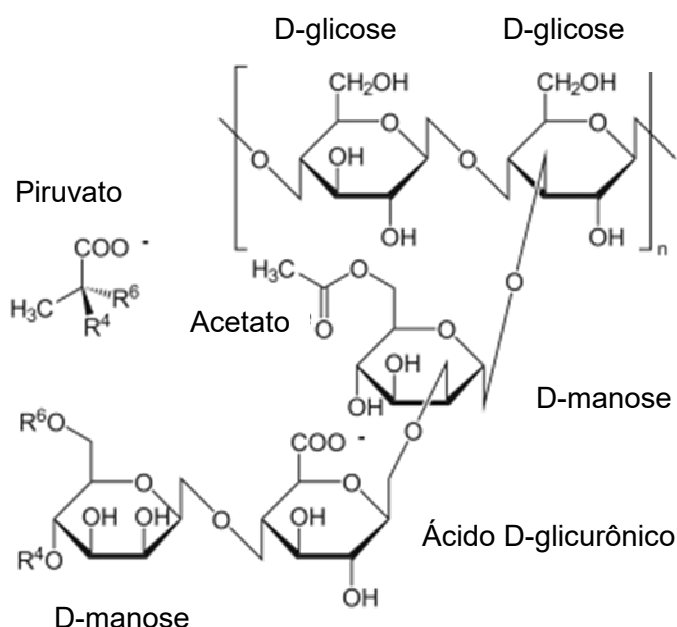


Figura 6. Estrutura química da goma xantana

Fonte: Petri (2015)

Rahdar e Almasi-Kashi (2016) citam que devido às propriedades físicas e químicas, biocompatibilidade, estruturas tridimensionais flexíveis, a goma xantana é aplicada em vários campos de estudo. Na literatura, observa-se que a incorporação de goma xantana em filmes biodegradáveis tem sido pouco reportada. Matta Junior (2011) estudou filmes de amido de ervilha associado de goma xantana e glicerol. Veiga-Santos et al. (2005) avaliaram propriedades mecânicas, atividade de água e hidrofiliicidade de filmes de amido-goma. Soares et al. (2005) verificaram a degradação térmica de filmes à base de goma xantana e amido de diferentes fontes. Ge et al. (2015) desenvolveram filmes à base de gelatina reticulado com dialdeído de goma xantana incorporado com montmorilonita. Lima et al. (2017a) estudaram as propriedades de filmes de quitosana adicionado de goma xantana. Lima et al. (2017b) avaliaram filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de pescado.

3 Capítulo 1 - Hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*): composição química, distribuição de peso molecular, atividade antioxidante e perfil de aminoácidos

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e avaliar hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) através da composição proximal, grau de hidrólise, atividade antioxidante, perfil de distribuição da massa molar e composição de aminoácidos. Filés de corvina foram hidrolisados com a enzima Alcalase 2.4L variando apenas o tempo, assim, foram obtidos hidrolisados com 2, 4 e 8 h de reação. Os teores de proteína dos hidrolisados variaram de 78,28 a 82,30%, onde o hidrolisado com maior tempo de reação mostrou maior grau de hidrólise (32,1%) e maior poder de inibição da oxidação pelos métodos ABTS e DPPH (98,35% e 54,11%, respectivamente). Tendo em vista a elevada ação antioxidante dos hidrolisados, eles constituem uma alternativa promissora de aditivos bioativos, adequados à aplicação em alimentos, a fim de melhorar a estabilidade e estender a vida útil dos mesmos por sua ação antioxidante.

Palavras-chave: hidrolisado enzimático; *Micropogonias furnieri*; atividade antioxidante; composição de aminoácidos.

3.1 Introdução

Nas últimas décadas, os hidrolisados proteicos de pescado têm sido alvo de muitas investigações científicas por serem considerados uma importante fonte de proteínas e peptídeos bioativos (NAJAFIAN e BABJI, 2012; LIASET et al., 2009; JE et al., 2009; KIM e WIJESEKARA, 2010). Os hidrolisados proteicos são produtos resultantes da clivagem de proteínas em peptídeos de diversos tamanhos, obtidos através de processos químicos ou enzimáticos. Os peptídeos bioativos são sequências curtas de aproximadamente 3-20 aminoácidos que possuem importantes atividades biológicas, tais como anti-hipertensiva, imunomoduladora, antitrombótica, antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana. (DI BERNARDINI et al., 2011; VERCRUYSSSE et al., 2005). Uma série de estudos demonstrou que os hidrolisados proteicos de pescado são fontes potenciais de peptídeos antioxidantes (BOUGATEF et al., 2010; YOU et al., 2010). Em razão disso, os peptídeos antioxidantes são vistos como uma alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos, por oferecerem menos risco à saúde (LIN e LIANG, 2002).

Os peptídeos antioxidantes de proteínas de pescado são considerados moléculas seguras, com baixa massa molecular, absorção fácil, baixo custo e alta atividade (SARMADI e ISMAIL, 2010). As propriedades antioxidantes dos peptídeos de pescado estão intimamente relacionadas a composição de aminoácidos, sequência e hidrofobicidade molecular (BOUGATEF et al., 2010; REN et al., 2008). You et al. (2010) relataram que os peptídeos antioxidantes possuem atividade quelante de metal, capacidade de doar elétrons ou hidrogênios, o que permite a eles interagirem com os radicais livres evitando ou finalizando as reações em cadeias.

O processo de hidrólise enzimática pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles, escolha da enzima e as condições de hidrólise. O controle destes parâmetros é fundamental na liberação e funcionalidade dos peptídeos, principalmente aqueles com propriedades antioxidantes. Várias pesquisas apontam o tempo como fator determinante na qualidade dos peptídeos, assim, reações com tempo mais prolongado resultam em peptídeos com maior poder antioxidante. Tendo em vista o presente trabalho, acredita-se que são desnecessárias reações prolongadas para obtenção destes produtos, uma vez que os hidrolisados provenientes de reações curtas apresentaram qualidade semelhante aos de reações médias e longas.

Laroque et al. (2008) relataram que a escolha da enzima é um fator importante a ser considerado no processo de hidrólise enzimática, uma vez que determina rendimento e funcionalidade dos peptídeos. A enzima Alcalase (endopeptidase bacteriana alcalina produzida a partir da fermentação submersa do *Bacillus licheniformis*) tem sido reputada como uma das melhores enzimas para hidrolisar proteínas de pescado (BHASKAR et al., 2007; GUERARD et al., 2010).

A corvina (*Micropogonias furnieri*) por ser considerada um pescado de elevado teor de proteína, 14.5-20.7% (BADOLATO et al., 1994) e baixo valor comercial (ZAVAREZE et al., 2014) pode ser uma excelente fonte utilizada na produção de hidrolisados proteicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*), obtidos com diferentes tempos de reação, quanto ao grau de hidrólise, atividade antioxidante, composição química, distribuição de massa molecular e perfil de aminoácidos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Para obtenção dos hidrolisados proteicos utilizou-se filés de corvina adquiridos no mercado local da cidade de Pelotas – RS, Brasil. A enzima Alcalase 2.4L foi adquirida pela Novozymes Latin America (Araucária, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.).

3.2.2 Obtenção dos hidrolisados proteicos

Os hidrolisados foram preparados de acordo com Zavareze (2012) com modificações. Os filés de corvina foram triturados e homogeneizados com água destilada na proporção de 1:6 (m/v), aquecidos a 80 °C por 20 min, seguindo as condições de hidrólise: proporção de enzima/proteína 2/100 (m/m); pH 8; temperatura de 50 °C; agitação de 300 rpm. Utilizou-se o método pH-Stat, com titulação constante de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol.L⁻¹. A quantidade desta solução adicionada foi anotada em intervalos de 10 min, para determinação do grau de hidrólise. Foram preparados hidrolisados com 2, 4 e 8 horas de reação.

3.2.3 Composição proximal

A composição química do músculo de pescado e do hidrolisado proteico foi avaliada de acordo com a metodologia da AOAC (2000). O conteúdo de umidade foi determinado em estufa a 105 °C até massa constante (método gravimétrico nº 950.46); o teor de proteínas foi determinado através da quantificação do nitrogênio total da amostra pelo método Kjeldahl usando fator de conversão de 6,25 (método de Kjeldahl nº 928.08); o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet (método de Soxhlet nº 960.39) e o teor de cinzas foi determinado em mufla a 500-600 °C (método gravimétrico nº 920.153). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4 Grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise definido como o número de ligações peptídicas hidrolisadas, foi expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}) de acordo com o método descrito por Adler-Nissen (1985). O GH foi calculado conforme a Equação 1.

$$GH = \frac{B \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, B é o volume (mL) de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante; N_b é a concentração molar da base; MP é a massa de proteína (g); α é o grau de dissociação; h_{total} é o número total de ligações peptídicas antes da reação.

3.2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos hidrolisados foi avaliada pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), conforme descrito por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. A solução do composto foi preparada dissolvendo-se 2,4 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Dessa forma, preparou-se uma solução estoque, a qual foi armazenada sob refrigeração até o momento da análise. A solução de trabalho de DPPH foi ajustada para uma

absorbância em torno de 0,97 com adição de metanol. Em seguida, misturou-se 3,9 mL de solução de trabalho de DPPH com 100 µL de amostra. A solução foi homogeneizada durante 1 min. em vórtice (Phoenix, AP-56) e mantida no escuro durante 24 h. Após este período realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Jenway, 6700 UV-Vis), no comprimento de onda a 517 nm. A captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi realizada conforme a metodologia de Re et al. (1999).

3.2.6 Perfil de distribuição da massa molar dos hidrolisados

O perfil de distribuição da massa molar dos hidrolisados foi avaliado por cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC), de acordo com a metodologia de Buggenhout et al. (2013) com algumas modificações. Uma coluna Yarra SEC-2000 e padrões Blue dextran (2 kDa), Cytochrome C (12 kDa), Cytidine (0,24 kDa), albumina (66 kDa) e phosphorylase b (97 kDa) foram utilizados. Protocolo de extração: meio não desnaturante (SDS) e meio desnaturante (SDS + Mercaptoetanol). Uma amostra de 10 mg de hidrolisado proteico foi extraída com 10 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 mol.L⁻¹; pH 6,8) contendo: (1) 2,0% de SDS; e (2) 2,0% SDS, 1% 2-Mercaptoetanol. O material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min e filtrado (polyethersulfone 0,45 µm, Millipore). Protocolo de teste: injeção de 10 µL, fluxo de 0,35 mL. min⁻¹, temperatura da coluna de 30 °C, gradiente móvel: tampão fosfato de sódio e 50 mM, pH 6,8 contendo 2,0% SDS.

3.2.7 Perfil de aminoácidos dos hidrolisados

O perfil de aminoácidos dos hidrolisados foi realizado no Centro de Química da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil). A avaliação dos aminoácidos foi realizada conforme a metodologia de Spackman et al. (1958).

3.2.8 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Composição química

O músculo de corvina apresentou 79,3% de umidade, 14,9% de proteínas, 1,2% de lipídios e 0,8% de cinzas. Curcho et al. (2009) encontraram resultados próximos: 77,9% de umidade, 19,6% de proteínas, 1,06% de cinzas e 1,46% de lipídios. Badolato et al. (1994) reportaram que a composição química da corvina pode variar de 77,2 a 83,8% de umidade, 14,5 a 20,7% de proteína, 0,8 a 1% de lipídios e 1,0 a 1,2% de cinzas. A composição química do pescado pode variar em função do tipo de músculo, sexo, idade, época do ano, habitat e dieta entre outros fatores (LUZIA et al., 2003).

A Tabela 1 mostra a composição química dos hidrolisados proteicos de corvina obtidos com 2, 4 e 8 horas de reação. Os teores de proteínas dos hidrolisados oscilaram entre 78,3 e 82,3%, no entanto, apresentaram diferenças significativas. O hidrolisado com menor tempo de reação apresentou o maior teor de proteínas. Quanto aos teores de umidade não foram observadas diferenças significativas entre os hidrolisados. Com relação ao teor de cinzas foi observado que quanto maior o tempo de reação maior o teor de cinzas. Alguns autores reportaram que o elevado teor de cinzas dos hidrolisados está relacionado com o uso de soluções ácidas ou básicas para ajuste do pH do meio (CHOI et al., 2009; DONG et al., 2005; PACHECO-AGUILAR et al., 2008).

Martins et al. (2009) ao estudarem hidrolisado enzimático a partir de corvina, encontraram 81,43% de proteína para a hidrólise com a flavourzyme e 70,53% de proteína para a alcalase; 12,98% de cinzas para a flavourzyme e 16,84% cinzas para a alcalase; 9,05% de lipídios para a hidrólise com a flavourzyme e 13,70% de lipídios para alcalase. Bougateg et al. (2009) relataram que as propriedades químicas dos hidrolisados depende de diversos fatores, tais como, reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima.

De acordo com a literatura, os hidrolisados de proteína de pescado apresentam teores de proteínas entre 60 e 90% e de cinzas entre 0,45 e 27%. O alto teor de proteína presente nos hidrolisados de proteínas de pescado é devido à solubilização de proteínas durante a hidrólise e a remoção da matéria sólida insolúvel por meio do processo de centrifugação (CHALAMAIAH et al., 2012).

A maior parte dos estudos demonstrou que os hidrolisados proteicos de pescados apresentam teor de lipídios inferiores a 5% e umidade inferior a 10%, o principal motivo pelo baixo teor de lipídios dos hidrolisados é o processo de centrifugação, que após esta operação, os lipídios são removidos juntamente com a frações de proteínas insolúveis (BUENO-SOLANO et al., 2009).

A Composição química dos hidrolisados proteicos de corvina obtidos com diferentes tempos de reação está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química (base seca) dos hidrolisados proteicos de corvina obtidos com diferentes tempos de reação.

Hidrolisados	Umidade	Proteínas	Lipídios	Cinzas
Tempo de hidrólise (h)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	3,7 ± 0,38 ^a	82,3 ± 0,82 ^a	4,4 ± 0,08 ^a	9,5 ± 0,14 ^c
4	4,1 ± 0,04 ^a	80,4 ± 0,87 ^b	4,1 ± 0,10 ^{ab}	10,5 ± 0,12 ^b
8	4,2 ± 0,15 ^a	78,3 ± 0,16 ^c	3,5 ± 0,33 ^b	11,7 ± 0,14 ^a

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

3.3.2 Grau de hidrólise (GH)

Bougatef et al. (2010) reportaram que o grau de hidrólise é um parâmetro crucial para produção de hidrolisados proteicos, uma vez que mede a extensão da degradação das proteínas pela protease, nesse sentido, é um indicador bastante utilizado para comparar diferentes hidrolisados proteicos. Os resultados de grau de hidrólise obtidos das proteínas do músculo de corvina com diferentes tempos de reação estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos obtidos do músculo de corvina com diferentes tempos de reação.

Tempo (min) ^a	Grau de hidrólise (%) ^a		
	Hidrolisado - 2h	Hidrolisado - 4h	Hidrolisado - 8h
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
30	13,5 ± 0,8	11,7 ± 0,6	12,4 ± 0,6
60	18,3 ± 0,6	16,3 ± 0,3	17,8 ± 0,9
90	20,7 ± 0,0	19,4 ± 0,1	21,0 ± 0,9
120	22,6 ± 0,1	21,6 ± 0,1	23,3 ± 0,8
150		23,3 ± 0,1	25,0 ± 0,6
180		24,6 ± 0,2	26,3 ± 0,5
210		25,7 ± 0,3	27,3 ± 0,4
240		26,7 ± 0,4	28,2 ± 0,4
270			28,9 ± 0,4
300			29,5 ± 0,4
330			30,0 ± 0,3
360			30,5 ± 0,4
390			31,0 ± 0,4
420			31,3 ± 0,5
450			31,7 ± 0,4
480			32,1 ± 0,5

^a Média de 3 repetições ± desvio padrão.

O grau de hidrólise das proteínas, obtidas do músculo de corvina, com 2, 4 e 8 horas apresentaram 22,6, 26,7 e 32,1%, respectivamente (Tabela 2). A enzima apresentou melhor atividade nos primeiros 60 min de reação, após esse tempo o grau de hidrólise variou lentamente. Isso indica que o maior percentual de peptídeos foi liberado na primeira hora de reação.

Centenaro et al. (2009), ao hidrolisarem músculo de corvina utilizando diferentes concentrações da enzima alcalase, encontraram valores de grau de hidrólise entre 12,2 a 43,7%. Zavareze et al. (2014) produziram hidrolisado proteico de músculo de corvina com a enzima flavourzyme na proporção substrato/tampão de 1:5 com 2% de enzima/substrato os autores obtiveram grau de hidrólise de 28,5%.

Benítez et al. (2008) relataram que o grau de hidrólise pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles a concentração de substrato, relação enzima/substrato, tempo de incubação, pH, temperatura e natureza da enzima, caracterizada por sua atividade específica e tipo de atividade.

De acordo com Vioque et al. (2006), os hidrolisados proteicos podem ser divididos em três grupos: a) hidrolisados com baixo grau de hidrólise (<10%), empregados para melhorar as propriedades funcionais das proteínas; b) hidrolisados com grau de hidrólise variável utilizados como agentes aromatizantes; c) hidrolisados com alto grau de hidrólise (>10%), utilizados em nutrição especializada e compostos bioativos. Sendo assim, os hidrolisados obtidos neste estudo são considerados de alto grau de hidrólise e em razão disso podem ser empregados como compostos bioativos com funções específicas como atividade opióide, imunorreguladora, antiúlcera, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante, além de serem utilizados como alimentos para fins especiais (KORHONEN e PIHLANTO, 2006; LEE et al., 2010).

3.3.3 Atividade antioxidante dos hidrolisados

Os hidrolisados de músculo de corvina foram liofilizados e tiveram sua atividade antioxidante avaliada através da capacidade de sequestro do radical livre (DPPH) e capacidade de sequestro do radical livre (ABTS).

A atividade antioxidante dos hidrolisados com diferentes tempos de reação está apresentada na Tabela 3. Houve diferenças significativas entre os hidrolisados proteicos, tanto pela captura do radical DPPH quanto pela captura do radical ABTS. O hidrolisado com maior tempo de reação mostrou maior grau de hidrólise (32,1%) e maior atividade de inibição de ABTS e DPPH, cerca de 98,4% e 54,1%, respectivamente. Apesar dos hidrolisados possuírem tempos de reação diferentes (2, 4 e 8 horas), foi observado que a atividade de inibição dos hidrolisados foi muito próximas para a captura do radical ABTS. Isso sugere que os peptídeos que apresentam atividade de inibição para este teste foram liberados nas primeiras duas horas de reação, após este tempo, a reação proteolítica continuou a produzir peptídeos com atividade antioxidante de forma muito lenta. LAROQUE et al. (2008) relataram que a liberação de peptídeos antioxidantes podem ser influenciado por diversos fatores, tais como a escolha do tratamento enzimático e as condições de

hidrólise (temperatura, pH, proporção de enzima/substrato e tempo de reação), além das propriedades do substrato.

A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos do músculo de corvina com diferentes tempos de reação pode ser vista na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos do músculo de corvina com diferentes tempos de reação.

Hidrolisado	ABTS (% Inibição da oxidação lipídica)	DPPH (% Inibição da oxidação lipídica)
Tempo de hidrólise (h)		
2	97,2 ± 0,2 ^c	40,4 ± 0,1 ^c
4	97,7 ± 0,2 ^b	48,0 ± 0,4 ^b
8	98,4 ± 0,2 ^a	54,1 ± 0,5 ^a

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

3.3.4 Perfil de distribuição da massa molar dos hidrolisados

O perfil da distribuição de massa molecular dos hidrolisados de corvina obtidos em diferentes tempos de reação está apresentado na Figura 7.

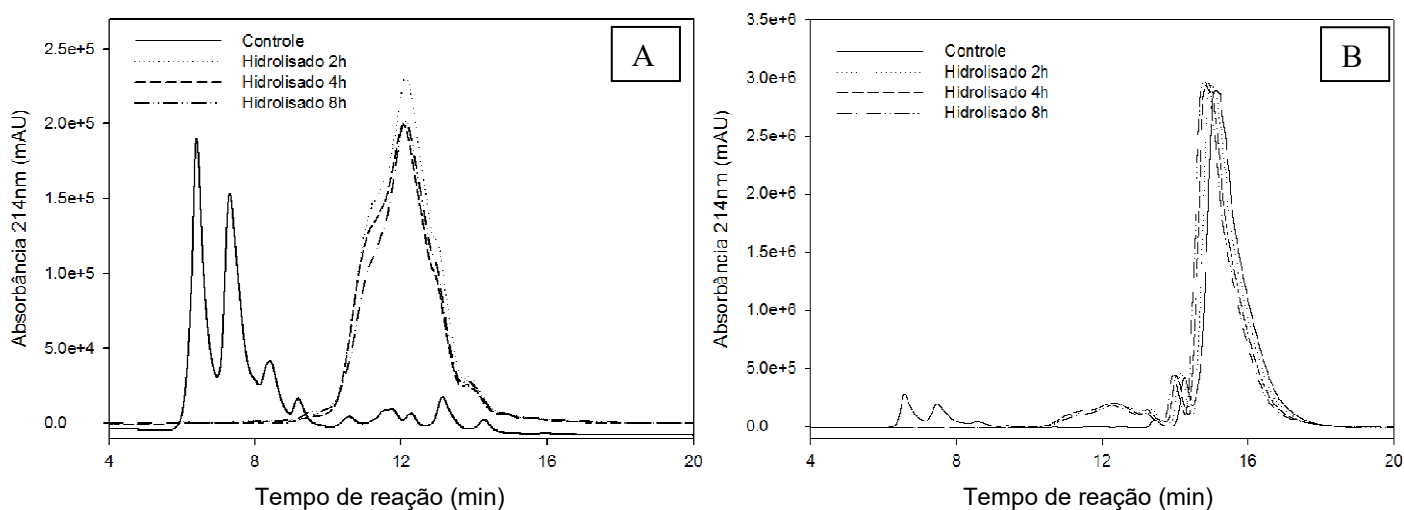


Figura 7. Perfil da distribuição de massa molecular dos hidrolisados de corvina. A: Extração em meio não desnaturante (2,0% SDS); B: Extração em meio desnaturante (2,0% SDS e 1% mercaptoetanol).

De acordo com a Figura 7, observa-se que todos os hidrolisados mostraram perfis semelhantes, com massa molecular menor que 10 kDa, predominando peptídeos com massa molecular de cerca de 2 kDa. Resultados semelhantes foram reportados por Ren et al. (2008) que ao hidrolisarem músculo de carpa prateada utilizando enzimas pancreatina e neutrase, encontraram peptídeos com massa molecular menor que 3 kDa.

3.3.5 Perfil de aminoácidos dos hidrolisados

O perfil de aminoácidos dos hidrolisados de corvina obtidos em diferentes tempos de reação estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Composição de aminoácidos dos hidrolisados de músculo de corvina

Aminoácido	Concentração (mg aminoácido/g proteína)		
	Hidrolisado - 2h	Hidrolisado - 4h	Hidrolisado - 8h
Asparagina	105,23 ± 0,86 ^a	102,80 ± 3,78 ^a	105,56 ± 0,74 ^a
Glutamato	173,11 ± 4,93 ^a	174,65 ± 1,15 ^a	169,52 ± 1,88 ^a
Serina	39,47 ± 1,63 ^a	38,83 ± 2,20 ^a	35,66 ± 3,14 ^a
Glicina	40,54 ± 0,19 ^a	39,64 ± 1,71 ^a	41,74 ± 0,08 ^a
Histidina	23,74 ± 2,46 ^a	23,95 ± 0,54 ^a	26,50 ± 0,86 ^a
Arginina	59,36 ± 0,52 ^a	58,97 ± 0,21 ^a	63,18 ± 5,52 ^a
Treonina	48,58 ± 0,58 ^a	48,12 ± 1,84 ^a	45,88 ± 1,80 ^a
Alanina	57,10 ± 1,49 ^a	57,40 ± 2,24 ^a	56,5 ± 0,21 ^a
Prolina	39,33 ± 0,94 ^a	40,13 ± 0,62 ^a	40,64 ± 0,23 ^a
Triptofano	34,81 ± 0,66 ^a	34,52 ± 0,14 ^a	32,04 ± 2,17 ^a
Valina	52,52 ± 1,13 ^a	53,37 ± 0,51 ^a	54,65 ± 1,64 ^a
Metionina	39,63 ± 0,58 ^a	38,74 ± 1,21 ^a	37,88 ± 0,92 ^a
Cisteína	5,09 ± 0,31 ^a	3,92 ± 0,86 ^a	4,45 ± 0,44 ^a
Isoleucina	42,77 ± 2,48 ^a	45,29 ± 1,30 ^a	48,18 ± 2,85 ^a
Leucina	96,42 ± 2,75 ^a	95,75 ± 2,89 ^a	97,88 ± 0,55 ^a
Fenilalanina	44,43 ± 0,33 ^a	44,64 ± 1,30 ^a	45,09 ± 0,67 ^a
Lisina	97,85 ± 1,41 ^a	99,41 ± 1,65 ^a	99,59 ± 1,37 ^a

^a Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Glutamato, asparagina, lisina e leucina foram os aminoácidos que apresentaram maior predominância nos hidrolisados enzimáticos de corvina (Tabela 4). Yang et al. (2011) relataram que a enzima alcalase hidrolisa preferencialmente o lado carbóxi das ligações peptídicas dos aminoácidos glutamato, glutamina, metionina, leucina, tirosina e lisina. Tendo em vista a presença destes aminoácidos na proteína da corvina, faz-se da enzima alcalase uma excelente protease para esse tipo de substrato.

Rajapakse et al. (2005) reportaram que a atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas e peptídeos está relacionada com a hidrofobicidade dos aminoácidos, sendo assim, quanto maior a hidrofobicidade maior a solubilidade em lipídios e por conseguinte, maior atividade antioxidante. Os aminoácidos presentes nos peptídeos tais como Leu, Val, Ala podem favorecer a capacidade de sequestrar radical livre, assim como daqueles que contêm resíduos de His podem apresentar forte atividade antioxidante devido a decomposição dos grupos imidazol (GAO et al., 2010). A arginina, por ser um aminoácido de caráter básico, confere ao peptídeo capacidade de doar prótons e quelar metais (ARCAN e YEMENICIOGLU, 2010).

Os aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu e Phe) presentes nos hidrolisados de 2, 4 e 8 h representam 40,7%, 40,9% e 40,8%, respectivamente, do total dos aminoácidos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Centenaro (2011) para hidrolisado de castanha (*Umbrina canosa*) com a enzima flavourzyme com 4 h de hidrólise, onde a quantidade de aminoácidos hidrofóbicos foi de 34,0%. Dong et al. (2008) ao hidrolisar músculo de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) com a enzima flavourzyme com 1,5 e 4 h de reação, encontraram 39,1% e 40,8% de aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente.

3.4 Conclusão

Este estudo demonstrou que foi possível produzir hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) com elevada atividade antioxidante. Os teores de proteínas dos hidrolisados oscilaram entre 78,3 e 82,3%, sendo que o hidrolisado com menor tempo de reação apresentou o maior teor de proteínas. O grau de hidrólise das proteínas hidrolisadas do músculo de corvina foi proporcional ao tempo

de reação, assim, os hidrolisados com 2, 4 e 8 horas apresentaram 22,6, 26,7 e 32,1%, respectivamente. Apesar dos hidrolisados possuírem tempos de reação diferentes (2, 4 e 8 horas) e apresentarem diferenças significativas para a captura do radical ABTS e DPPH, foi observado que a atividade de inibição dos hidrolisados foram próximas principalmente para a captura do radical ABTS, mostrando que tempos longos de reações não são necessários para obter hidrolisado com elevada ação antioxidante. No que tange ao perfil de aminoácidos, não foi observado diferença significativa entre os hidrolisados com 2, 4 e 8 horas de reação. Todos os hidrolisados apresentaram peso molecular menor que 10 kDa, sendo que a maioria dos peptídeos exibiram peso molecular em torno de 2 kDa. Tendo em vista a potencialidade dos hidrolisados proteicos de pescado, é sugerido que estes são produtos adequados para serem utilizados pela indústria, a fim de impedir a oxidação lipídica dos alimentos.

4 Capítulo 2 - Propriedades estruturais, térmicas, físicas, mecânicas e de barreira de filmes de quitosana adicionado de goma xantana

Resumo

Os filmes à base de quitosana e goma xantana foram preparados utilizando a técnica de *casting* com o objetivo de investigar o potencial destes polímeros como materiais de embalagem. Foram estudadas seis formulações de filmes variando a proporção de quitosana e goma xantana: 100:0 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q100GX0); 90:10 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q90GX10); 80:20 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q80GX20); 70:30 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q70GX30); 60:40 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q60GX40); e 50:50 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q50GX50). A quantidade total de sólidos (quitosana e goma xantana) na solução filmogênica foi de 1,5 g por 100 mL de solução aquosa para todos os tratamentos, de acordo com a proporção de cada polímero. Os filmes foram avaliados por seus grupos funcionais, propriedades estruturais, térmicas, morfológicas, físicas, mecânicas ópticas e de barreira. Todos os filmes apresentaram picos endotérmicos no intervalo de 122 a 175 °C e picos exotérmicos largos acima de 200 °C, que foram atribuídos à temperatura de fusão e à decomposição térmica, respectivamente. Estes resultados demonstraram que os filmes com goma xantana têm o T_m e o $\Delta_m H$ mais elevados. Os filmes que contêm maior teor de goma xantana mostram também maior resistência à tração e menor alongação. A adição de goma xantana não afetou a permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e umidade dos filmes. Este conjunto de dados sugere a formação de complexos de quitosana-xantana nos filmes.

Palavras-chave: quitosana; goma xantana; filmes; propriedades estruturais; propriedades mecânicas.

4.1 Introdução

Muitas pesquisas estão focadas no desenvolvimento de materiais biodegradáveis que possam ser utilizados em embalagens de alimentos com a finalidade de substituir os polímeros sintéticos à base de petróleo (CHENG et al., 2015; SHARIATINIA e FAZLI, 2015). Existe uma demanda significativa na produção de bioplástico, e segundo a BCC Research em 2013, a manufatura destes rendeu 1,1 milhões de toneladas métricas. Assim, a expectativa para o ano de 2019 é que esta produção possa quintuplicar (BCC, 2014).

Vários fatores contribuíram com o aumento da utilização de bioplásticos, tais como a diminuição das reservas de petróleo, o grande impacto ambiental causado pelos plásticos sintéticos devido à sua natureza não biodegradável e não-renovável, além do preço oscilante do petróleo (MARTINS et al., 2012). Apesar dos biopolímeros apresentarem potencialidade para substituição parcial dos plásticos convencionais, o uso destes na indústria de embalagens apresenta limitações devido à sua fragilidade, alta permeabilidade ao vapor de água e gases, solubilidade em água, dentre outras (MU et al., 2012).

Os materiais mais utilizados em filmes são polissacarídeos, proteínas e lipídios, dentre eles amido, celulose, alginato, gomas, quitosana, pectina, caseína, zeína, glúten, queratina, albumina, ceras e óleos minerais (DIÉGUEZ et al., 2015; PORTA et al., 2015). A partir destes materiais, a quitosana vem se destacando no desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis por apresentar propriedades tecnológicas adequadas quando aplicada em alimentos, tais como biocompatibilidade, permeabilidade seletiva de gases (CO_2 e O_2), propriedades antimicrobianas, não poluentes, não tóxicas, além disso, requer baixos investimentos financeiros (ELSABEE e ABDOL, 2013; CASARIEGO et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina, obtida pela desacetilação parcial da quitina, adquirida a partir dos exoesqueletos de crustáceos, tais como camarão e caranguejo. A utilização de quitosana na produção de filmes biodegradáveis vem sendo estudada por diversos pesquisadores (YOUSSEF et al., 2015).

A goma xantana é um polímero de origem natural produzido por fermentação aeróbica submersa de cultura pura do gênero *Xanthomonas campestris*. É constituída por repetidas unidades pentassacarídicas de β -Dglicose unidas por ligação 1-4, formando a cadeia principal. A cadeia lateral é composta de β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico 1,2- α -D-manose (FITZPATRICK et al., 2013; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2014).

De acordo com a literatura, este polímero pode ser aplicado em vários setores industriais (alimentos, cosméticos, farmacêuticos e petróleo). Outra vantagem relacionada a goma xantana é a estabilidade em grandes variações de temperaturas e pH (altos e baixos) (GARCIA-OCHOA et al., 2000). O uso da goma xantana em filmes biodegradáveis tem sido pouco relatado na literatura (VEIGA-SANTOS et al., 2005; SOARES et al., 2005; GE et al., 2015).

A quitosana apresenta grupos amino em sua estrutura e é considerada um polieletrólito catiônico em pH abaixo de 6,5, o que permite a sua interação com materiais carregados negativamente (SANDFORD 1992). A goma xantana é considerada um polieletrólito aniônico devido aos grupos carboxilato (RICHARDSON e ROSS-MURPHY 1987). A mistura de polieletrólitos com cargas opostas resulta em um complexo polieletrólítico (PEC), o qual apresenta propriedades físicas e químicas peculiares, como interações eletrostáticas, que são consideradas mais fortes do que as interações secundárias (LEE et al., 2003). Os géis de PEC de quitosana-goma xantana e suas aplicações têm sido amplamente relatados na literatura (HORN et al., 2015; ARGIN-SOYSAL et al., 2009; CHU et al., 1995). Entretanto, a interação da goma xantana com quitosana no desenvolvimento de filmes degradáveis tem sido pouco investigada. O objetivo deste estudo foi desenvolver filmes de quitosana com a adição de goma xantana e investigar as propriedades destes filmes.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material

A quitosana, proveniente da empresa Polymar Ciência e Nutrição S/A, Fortaleza-CE, Brasil, possui as seguintes características: granulometria de 80 mesh, densidade aparente de 0,32 g/mL, pH de 7,9, cinzas totais de 1,35% e grau de desacetilação de 86,3%. A goma xantana foi doada pela empresa CP Kelco Brasil

S.A, Limeira-SP, Brasil, e apresenta as seguintes características: tamanho de partícula de 180 μm , umidade de 11% e pH de 6,3. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

4.2.2 Elaboração dos filmes

A elaboração dos filmes foi realizada utilizando a técnica de *casting*, conforme metodologia citada por ARAUJO-FARRO et al. (2010), com algumas modificações. Foram estudadas seis formulações de filmes variando a proporção de quitosana e goma xantana: 100:0 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q100GX0); 90:10 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q90GX10); 80:20 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q80GX20); 70:30 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q70GX30); 60:40 (quitosana:goma xantana, m/m, filme Q60GX40); e 50:50 (quitosana:goma xantana, m/m, filme G50GX50). A quantidade total de sólidos (quitosana e goma xantana) na solução filmogênica foi de 1,5 g por 100 mL de solução aquosa para todos os tratamentos, de acordo com a proporção de cada polímero.

Soluções de goma xantana foram preparadas por adição lenta do pó em 50 mL de água destilada sob agitação constante em um agitador magnético à temperatura ambiente durante 12 h. A quitosana foi dispersa em 50 mL de água destilada contendo 1% (v/v) de ácido acético por meio de agitação suave em temperatura ambiente até a dissolução completa. Adicionou-se glicerol em um teor de 0,30 g de glicerol/g de polímero seco às dispersões de goma xantana e quitosana para cada tratamento, como plastificante. As dispersões foram submetidas à agitação em Ultra-Turrax (Tecnal, Turratec TE102) a 20.000 rpm por 10 min. para completa homogeneização. Na sequência, as soluções filmogênicas foram espalhadas (25 g) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais foram colocadas em estufa com circulação de ar (QUIMIS, modelo 314D 242) a 38°C por 18 horas. Após a secagem, os filmes foram armazenados adequadamente por 48 horas até o início das análises.

4.2.3 Caracterização dos filmes

4.2.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho das amostras de filmes foram obtidos em um espectrómetro Shimadzu, modelo Affinity-1 (Japão), acoplado a um acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR), modelo Miracle A, Pike Technologies. As análises foram realizadas em intervalos de 4000 a 700 cm^{-1} com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Foram acumuladas 32 varredura para cada espectro, com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.3.2 Padrão de difração de raios-X

Os padrões de difração de raios-X foram obtidos através de um difractômetro de raios-X (D8 ADVANCE/DAVINCI, Alemanha) utilizando voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA em tubo de cobre (radiação Cu K α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Os padrões de difração foram obtidos à temperatura ambiente e intervalo de ângulo de 5 a 120°.

4.2.3.3 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos filmes foram realizadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC-60, Kyoto, Japão) com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, de 30 a 500 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. As amostras de filmes com cerca de 4 a 5 mg foram hermeticamente seladas em cápsulas de alumínio. Utilizou-se uma cápsula de alumínio vazia selada hermeticamente como material de referência.

As propriedades termogravimétricas dos filmes foram obtidas utilizando um analisador termogravimétrico (Shimadzu, modelo DTG-60, Kyoto, Japão). Uma amostra com aproximadamente 4-6 mg foi aquecida em cadinho de platina a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. entre 30 e 900 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

4.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos filmes foi avaliada através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6610LV, Tokyo, Japão) operado a 10 kV. As amostras dos filmes foram

recobertas com ouro para melhorar a condutibilidade e fotografadas com uma ampliação de 1000x.

4.2.3.5 Umidade, espessura e solubilidade dos filmes em água e em ácido

O teor de umidade dos filmes foi avaliado em estufa a 105 °C até massa constante (AOAC, 1995). A espessura dos filmes foi avaliada em micrômetro digital (marca INSIZE), onde sete pontos diferentes de cada filme foram avaliados.

A solubilidade em água dos filmes foi avaliada de acordo com a metodologia citada por (GONTARD et al., 1994). Os pedaços de filmes de aproximadamente 2 cm de diâmetro foram cortados com lâminas e pesados antes e após o processo de secagem em estufa a 105 °C por 24 h. Após este processo os mesmos foram imersos em 50 mL de água destilada e submetidos a agitação a 125 rpm por 24 h em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os filmes foram secos e pesados como descrito anteriormente, a fim de determinar a porcentagem de matéria seca da película solubilizada. A porcentagem da solubilidade dos filmes foram calculadas através da Equação 2.

$$S(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, S é a solubilidade em água (%); m_i é a massa seca inicial da amostra (g); m_f é a massa seca final da amostra (g).

A solubilidade dos filmes em ácido foi avaliada pelo mesmo princípio da solubilidade em água, no entanto, utilizando ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ ao invés de água.

4.2.3.6 Cor e opacidade

Os parâmetros de cor dos filmes foram obtidos utilizando um colorímetro (Minolta, CR 400, Osaka, Japão). A cor foi obtida pelo sistema CIEL*a*b e a opacidade (Y) foi calculada seguindo a metodologia de Hunterlab (1997), avaliando a razão do filme sobreposto ao padrão preto (Yp) pelo filme sobreposto ao padrão branco (Yb), conforme a Equação 3.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad \text{Equação (3)}$$

4.2.3.7 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

As propriedades mecânicas de resistência à tração e alongação foram determinadas através de um texturômetro (Texture Analyser TA.XT plus, Stable Micro Systems) de acordo com o método ATM D 882 (ASTM, 2000), com separação inicial de 50 mm e velocidade do probe de 1 mm/s. As dimensões dos filmes foi de 8,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A resistência à tração foi determinada através da Equação 4 e a alongação (E) foi calculada utilizando a Equação 5.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde, RT é a resistência à tração (MPa); F_m é a força máxima no momento da ruptura (N); A é a área da secção transversal do filme (m^2);

$$E = \frac{d_r - d_o}{d_o} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, E é a alongação (%); d_o é a separação inicial entre as garras (cm); d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

Para a determinação da permeabilidade ao vapor de água dos filmes utilizou-se o método padrão E96-95 ASTM (ASTM 1995). As amostras de filmes foram cuidadosamente alocadas e lacradas sobre células apropriadas contendo $CaCl_2$ (0% UR). Em seguida, as células foram mantidas dentro de um dessecador com umidade controlada até atingir a estabilidade. A fim de manter o controle da umidade (75% UR) a temperatura ambiente (25 °C) utilizou-se uma solução saturada de NaCl. A massa das células foi, então, medida a cada 24 h. A permeabilidade dos filmes foi calculada conforme a Equação 6.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times A} \times \frac{L}{\Delta P} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde, PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$); ΔW é o ganho de massa pela célula (g); L é a espessura inicial da película (m); t é o tempo de armazenamento (s); A é a área do filme exposto (m^2); ΔP é a diferença de pressão parcial (Pa).

4.2.4 Análise estatística

A espessura dos filmes foi obtida pela média de sete medições em diferentes pontos do filme. A umidade, solubilidade em água/ácido, propriedades mecânicas, parâmetros de cor e permeabilidade ao vapor de água foram obtidas a partir da média de três análises. Estes resultados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 pH precursor

A quitosana e a goma xantana são classificadas como polieletrólitos, uma vez que possuem grupos potencialmente ionizáveis. Um complexo polieletrólítico (PEC) pode ser obtido por reação de complexação entre estes biopolímeros. A reação de complexação entre quitosana e goma xantana ocorre devido às interações entre as cargas opostas presentes nestes biopolímeros (grupos NH_3^+ na quitosana e grupos COO^- da goma xantana) (HORN et al., 2015). As propriedades moleculares do complexo polimérico formado pela quitosana e goma xantana podem ser influenciadas por vários fatores, sendo os mais conhecidos: alteração das condições de complexação (concentração de polímero, pH da solução de quitosana, proporção de polímeros na mistura e tempo de complexação), massa molecular, grau de desacetilação da quitosana e teor de ácido pirúvico presente na goma xantana (DUMITRIU 2002; MAGNIN et al., 2004). Assim, o pH da solução polieletrólítica é um parâmetro importante, uma vez que a estrutura e as propriedades do complexo dependem do grau de ionização dos polieletrólitos.

Em nosso estudo, o pH das soluções filmogênicas foi medido antes da preparação dos filmes. A solução filmogênica contendo apenas quitosana

(Q100GX0) mostrou pH 4,2. As soluções filmogênicas contendo tanto quitosana quanto goma xantana mostraram pH 4,58 (Q90GX10), 4,44 (Q80GX20), 4,42 (Q70GX30), 4,35 (Q60GX40) e 4,30 (Q50GX50). De acordo com a literatura, as soluções filmogênicas de quitosana têm grau de ionização próximo de 1 e quase todos os grupos amina da quitosana estão protonados (NH_3^+) (ARGIN-SOYSAL et al., 2009). Nesta condição de pH, o grau de ligações iônicas entre quitosana e goma xantana é maior. Além disso, as cadeias de polímero estão mais estendidas nesta faixa de pH, o que resulta em maior raio de giro e interações mais intensas entre as cadeias poliméricas. Assim, nestes valores de pH, as interações iônicas são mais importantes do que as interações secundárias.

Argin-Soysal et al. (2009) relataram que a densidade de carga da quitosana pode ser reduzida à medida que o pH aumenta, sendo assim, constataram uma redução de aproximadamente 50% quando o pH aumentou de 4,5 para 6,2.

4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho dos filmes

O espectro da Figura 8A mostra uma banda larga centrada em 3268 cm^{-1} , que pode ser atribuída a modos de estiramento OH e NH envolvidos extensivamente em ligações de hidrogênio inter e intra moleculares dos componentes dos filmes (quitosana, goma xantana e glicerol). Os grupos OH podem ser observados na estrutura de todos os componentes dos filmes enquanto os grupos NH são observados apenas na quitosana. O espectro também mostra outras bandas atribuídas a modos de vibração que estão presentes em todos os componentes dos filmes, tais como modos de estiramento CH entre 3000 e 2800 cm^{-1} , modos de deformação CH_2 em 1407 cm^{-1} , modos de deformação CH_3 em 1377 cm^{-1} , modos de estiramento CN em 1318 cm^{-1} e modos de estiramento CO centrados em 1027 cm^{-1} . Estas bandas foram observadas também nos espectros obtidos por Fernandez-Saiz et al. (2009) e Ziani et al. (2008).

Algumas modificações podem ser observadas nos espectros entre 1750 e 1500 cm^{-1} quando a goma xantana é adicionada aos filmes de quitosana, como mostra a região expandida na Figura 8B. A banda observada em 1557 cm^{-1} pode ser atribuída a modos de deformação NH_2 de grupos amina presentes na quitosana e a banda em 1641 cm^{-1} pode ser atribuída a modos de deformação HOH de moléculas de água adsorvidas nos filmes. Deve notar-se que a banda atribuída aos modos de

deformação NH_2 não se mostra tão definida à medida que a quantidade relativa de goma xantana aumenta nos filmes ($a \rightarrow f$), ocorrendo uma coalescência parcial dos modos de deformação NH_2 e HOH , de acordo com a Figura 8B. Os modos de deformação NH_2 da quitosana pura (na caixa, Fig. 8A) podem ser observados em 1570 cm^{-1} , sugerindo que esta banda está deslocada para um número de onda menor nos filmes devido às ligações de hidrogênio entre quitosana, goma xantana e glicerol, o que perturba os modos vibracionais. A coalescência foi observada especialmente para os filmes Q60GX40 e Q50GX50, podendo indicar a formação de complexos polieletrólíticos de quitosana-goma xantana.

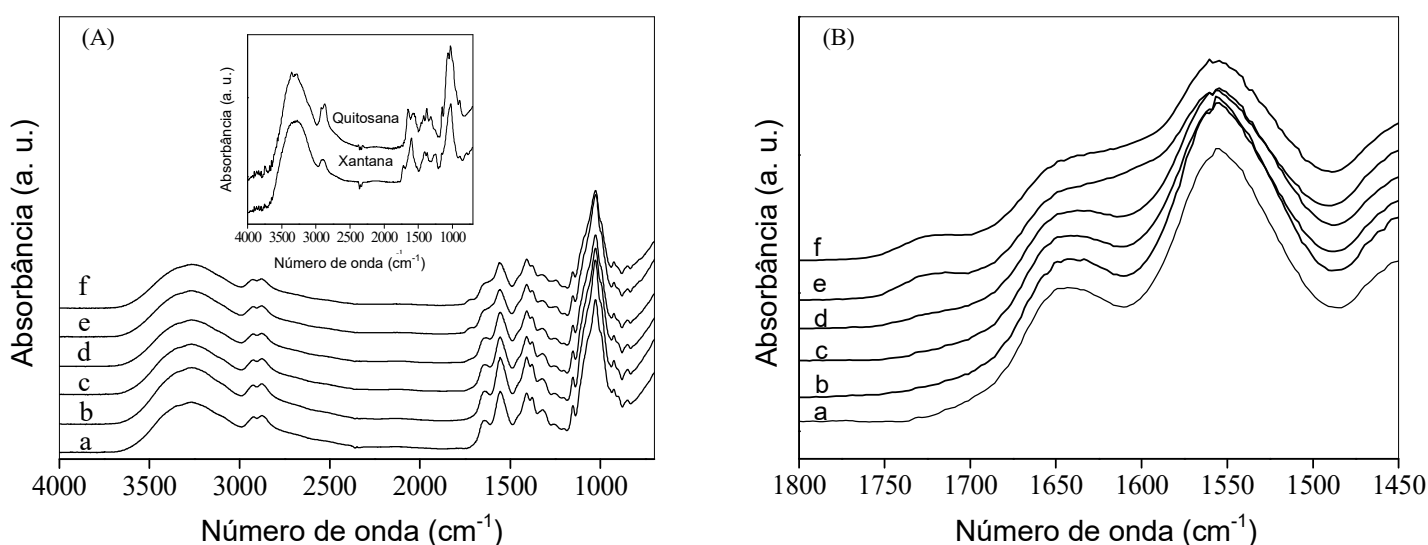


Figura 8. Espectros de infravermelho dos filmes e polímeros puros (A); Região expandida dos espectros entre 1800 e 1450 cm^{-1} (B). Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f).

4.3.3 Padrão de difração de raios-X

Como pode ser observado no difratograma dentro da caixa, na Figura 9, a quitosana exibe dois picos característicos em 2θ próximos de 10° e 20° . Difratogramas de raios-X de quitosana contendo estas características também foram observados por outros autores (SOUZA et al., 2010; WAN et al., 2006; ZIANI et al., 2008).

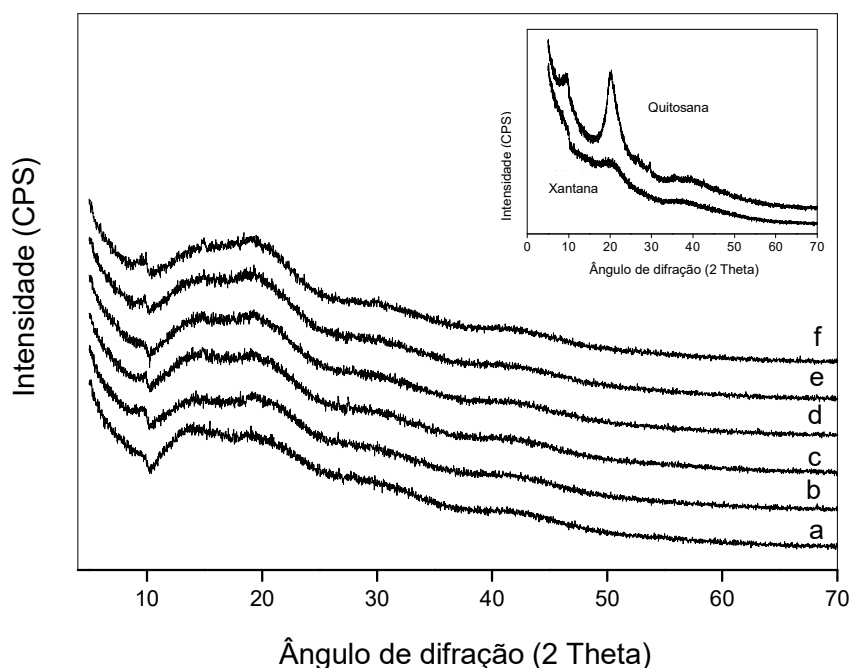


Figura 9. Difractogramas de raios-X dos filmes Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Os difractogramas de polímeros puros estão dentro da caixa.

Wan et al. (2006) relataram que o pico largo centrado em 10° é atribuído a estrutura cristalina hidratada da quitosana, em que as moléculas de água estão ligadas a rede cristalina, enquanto o pico centrado em 20° é relatado como sendo uma reflexão do plano (110) da quitosana, indicando uma rede cristalina relativamente mais regular do que a primeira. Zhang et al. (2006) demonstraram que o pico em torno de 10° está associado a presença de uma fase cristalina de forma I (menos cristalina) e o pico em 20° corresponde a uma fase cristalina na forma II (mais cristalina). A quitosana é considerada um material semicristalino, cuja fase cristalina está dispersa na fase amorfa. A semicristalinidade se deve ao balanço de energia livre associado a formação das ligações de hidrogênio para a quitosana (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Por outro lado, o difratograma da goma xantana (na caixa) não apresenta picos associados a uma organização de curto alcance das cadeias, de modo que apenas picos largos são observados. Isto ocorre possivelmente devido a presença de cadeias laterais do tipo β -D-mannose-1,4- β -D-ácido glicurônico 1,2- α -D-mannose na estrutura química da goma xantana, o que dificulta o empacotamento das cadeias poliméricas.

Observou-se um perfil diferente nos padrões encontrados na análise de difração de raios-X dos filmes (Figura 9a→f) em comparação com os polímeros puros. Em todos os filmes o pico associado à fase mais cristalina da quitosana não foi observado em 20° . De acordo com Thakhiew et al. (2015) este comportamento pode ser atribuído as intensas forças mecânicas produzidas no decorrer do processo de homogeneização, o que proporcionou a formação de pequenas gotículas do glicerol, tendo como consequência o aumento de sua capacidade plastificante.

Hu et al. (2009) relataram que a ação de dispersar o plastificante no meio (glicerol, sorbitol, dentre outros), possivelmente dificulta o rearranjo das cadeias poliméricas e também a formação de fases cristalinas.

O processo de homogeneização pode aquecer a solução filmogênica. Rubentheren et al. (2016) relataram que o aquecimento da solução filmogênica pode afetar a estrutura molecular da quitosana. O pico associado a fase cristalina hidratada, em 2θ igual a 10° , pode ser observado no difratograma do filme, o que indica que ainda há um grau de ordenamento das cadeias e moléculas de água. Para os filmes contendo teores crescentes de goma xantana, não foram observadas mudanças significativas entre os filmes, mostrando a perda de cristalinidade em todos os filme com relação a quitosana pura. Isto sugere que ocorreu uma interpenetração do glicerol nas cadeias da quitosana, destruindo a fase mais cristalina pela formação de novas ligações de hidrogênio com o glicerol e também com a goma xantana.

4.3.4 Propriedades térmicas e termogravimétricas dos filmes

Os resultados da análise de DSC dos filmes de quitosana e quitosana incorporados de goma xantana estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades térmicas dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana e de polímeros puros.

Amostras		T_m (°C) ^a	$\Delta_m H$ (J/g) ^b	T_d (°C) ^c	$\Delta_d H$ (J/g) ^d
Filmes	Q100GX0	149	248	254 - 337	-150
	Q90GX10	122	349	246 - 327	-142
	Q80GX20	167	278	240 - 331	-170
	Q70GX30	175	330	237 - 331	-180
	Q60GX40	171	296	234 - 327	-198
	Q50GX50	160	286	235 - 332	-200
	Quitosana em pó	155	200	288 - 321	-173
Polímeros puros	Goma xantana em pó	148	271	280 - 347	-176

^a T_m = temperatura de fusão; ^b $\Delta_m H$ = variação de entalpia de fusão; ^c T_d = temperatura de degradação; ^d $\Delta_d H$ = variação da entalpia de degradação.

A temperatura de fusão do filme Q100GX0 foi observada em 149 °C. O pico de T_m pode ser observado em diferentes temperaturas para os filmes contendo a mistura de quitosana e goma xantana. A temperatura de fusão dos filmes contendo goma xantana aumentou quando comparada com o filme Q100GX0, com exceção do filme Q90GX10. A variação de entalpia do processo de fusão tem um perfil randômico. No entanto, os valores obtidos para filmes contendo goma xantana são superiores ao valor obtido para o filme Q100GX0, o que poderia sugerir fortes interações entre as cadeias poliméricas, tais como a formação de complexos de quitosana-goma xantana. Os maiores valores de T_m e $\Delta_m H$ dos filmes contendo goma xantana poderiam estar relacionados à menor mobilidade de cadeias associadas por interações eletrostáticas entre os polieletrólitos. Esta hipótese pode ser suportada pela temperatura de fusão dos biopolímeros puros, cujos valores são inferiores aos atingidos para filmes contendo pelo menos 20% de goma xantana.

Todos os filmes apresentaram um pico exotérmico acima de 200 °C, que pode ser atribuído à degradação térmica do material. Pereira et al. (2015) reportaram que o processo de decomposição dos filmes de quitosana iniciou a partir de 250 °C e prosseguiu até 830 °C. Em nosso estudo, a decomposição térmica de filmes

contendo goma xantana iniciou em temperaturas ligeiramente inferiores à temperatura observada por Pereira et al. (2015), como mostra a Tabela 5. Todos os filmes possuem temperatura de decomposição menor que a obtida para os biopolímeros puros, provavelmente pela presença de pequenas moléculas como o glicerol na composição dos filmes. Além disso, a goma xantana apresenta em sua estrutura carbonos terciários, de onde surgem as cadeias laterais. Usualmente, polímeros ramificados apresentam temperatura de degradação térmica menor do que polímeros contendo cadeias lineares. Com relação a variação de entalpia de degradação, foi observado um aumento em módulo à medida que o teor de goma xantana foi aumentado, ou seja, o processo de decomposição do polímero tornou-se mais exotérmico à medida que o teor de goma xantana aumentou.

A perda de massa dos filmes de quitosana adicionados de goma xantana e dos polímeros puros, quando submetidos ao tratamento térmico, está apresentada na Figura 10.

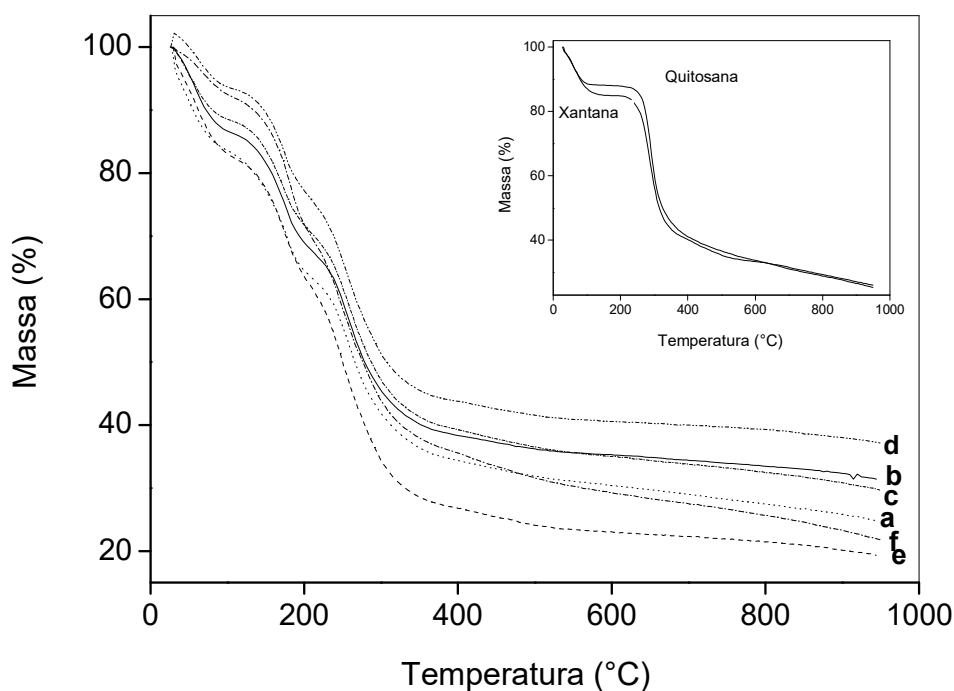


Figura 10. Termogramas dos filmes Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Os termogramas dos polímeros puros estão dentro da caixa.

Os termogramas mostram que a quitosana pura e a goma xantana (Figura 10) tiveram uma perda de massa entre 10 e 15% até 100 °C, o que pode ser atribuído a

água adsorvida no material. Após esta temperatura, os materiais não apresentaram perda de peso até 240 °C para a quitosana e 220 °C para a goma xantana, quando então ocorreu a decomposição térmica dos materiais em uma única etapa até aproximadamente 380 °C, com perda de massa entre 40 e 50%. A decomposição térmica ocorreu continuamente após 380 °C a uma taxa mais lenta até final da análise, em aproximadamente 950 °C.

Para todos os filmes estudados, uma perda de massa inicial de água adsorvida foi seguida pela desidroxilação do glicerol e dos biopolímeros e, em seguida, pela decomposição da matéria orgânica desses componentes. A desidroxilação dos componentes orgânicos, que estão associados por ligações de hidrogênio e por complexação quitosana-goma xantana, ocorreu com maior intensidade após 150 °C (Figura 10). No entanto, é possível observar uma mudança de inclinação nas curvas após 80 °C. A perda de massa foi lenta e contínua entre 80 e 150 °C, e nenhum patamar de estabilidade térmica foi observado nas curvas. De acordo com Lawal et al. (2005), a decomposição do glicerol ocorre no intervalo entre 120 e 300 °C.

Provavelmente, a desidroxilação de os componentes orgânicos começou antes de 120 °C. Acredita-se que a eliminação de água adsorvida pode aproximar as cadeias dos componentes orgânicos nos filmes e assim, induzir o processo de desidroxilação a temperaturas mais baixas. Não se observou um patamar de estabilidade térmica antes da decomposição do material orgânico dos componentes, cuja perda de massa começou provavelmente antes de terminar a fase de desidroxilação. O perfil diferente dos termogramas dos filmes em comparação com os termogramas dos biopolímeros puros sugere uma forte interação entre os componentes orgânicos. A presença de cadeias pequenas de glicerol e das cadeias laterais de caráter polar da goma xantana, por exemplo, induzem a decomposição da matéria orgânica a temperaturas mais baixas ou mesmo em várias etapas. Soares et al. (2005) observaram que a decomposição da goma xantana começou com as cadeias laterais, seguida pela quebra da cadeia principal. Neste trabalho, é possível observar uma perda de massa contínua e em muitas etapas durante a análise, o que demonstra a interação dos componentes nos filmes.

4.3.5 Morfologia dos filmes

A morfologia dos filmes de quitosana foi afetada pela adição de goma xantana (Figura 11).

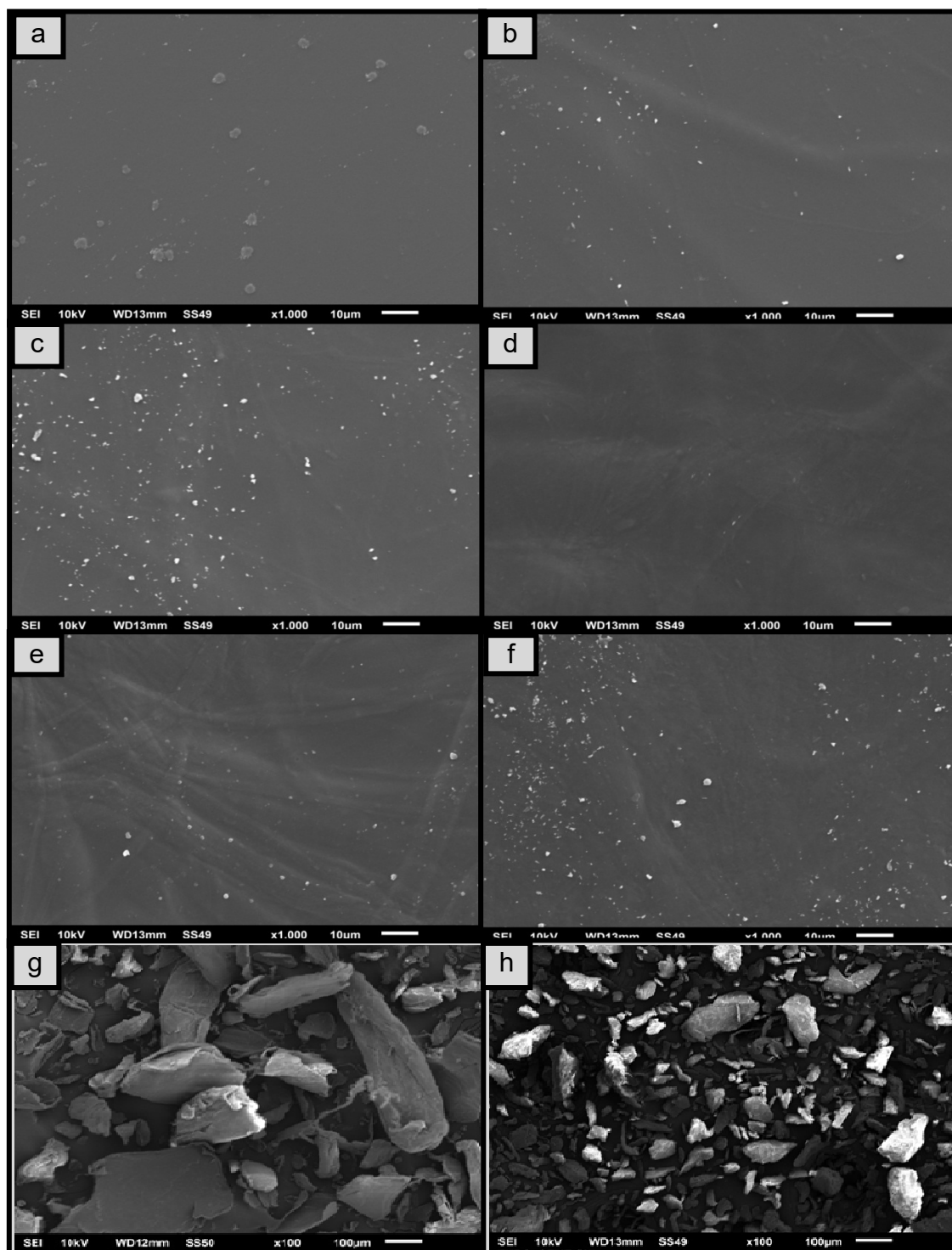


Figura 11. Micrografias da superfície dos filmes: Q100GX0 (a), Q90GX10 (b), Q80GX20 (c), Q70GX30 (d), Q60GX40 (e) e Q50GX50 (f). Micrografias de quitosana em pó (g) e goma xantana em pó (h).

Os filmes de quitosana contendo goma xantana e também o filme sem adição de goma xantana (Figura 11) exibiram uma superfície contínua livre de fissuras, sugerindo uma matriz coesa. Estes resultados estão provavelmente, associados à adição de plastificante na preparação de filmes. Os plastificantes são normalmente polióis que são incorporados em películas de polímero com o objetivo de reduzir as forças de interação entre as cadeias de polímero, aumentando a mobilidade molecular e melhorando a flexibilidade das películas. Shahbazi et al. (2016) disseram que a falta de plastificante em filmes de quitosana pura provoca fissuras e irregularidades na morfologia das películas.

De acordo com a morfologia dos filmes, observou-se que filmes contendo goma xantana exibiam estruturas morfológicas semelhantes e diferiam apenas pela presença de partículas protuberantes; isto pode ser possivelmente devido à partículas não dissolvidas presentes na goma xantana pura (Figura 11h). A microestrutura dos filmes depende das interações entre os componentes do filme.

4.3.6 Teor de umidade, solubilidade em água e em ácido dos filmes

Os valores de umidade, solubilidade em água e em ácido dos filmes de quitosana e xantana em diferentes proporções estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de umidade, solubilidade em água e em ácido dos filmes de quitosana e goma xantana.

Filmes	Umidade (%)	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em ácido (%)
Q100GX0	18,65 ± 0,31 ^b	21,99 ± 0,64 ^a	22,37 ± 0,63 ^a
Q90GX10	19,26 ± 0,42 ^b	21,59 ± 0,54 ^a	21,38 ± 0,23 ^a
Q80GX20	21,56 ± 0,75 ^a	22,33 ± 0,40 ^a	21,45 ± 0,79 ^a
Q70GX30	21,07 ± 0,57 ^a	21,98 ± 0,51 ^a	21,90 ± 0,84 ^a
Q60GX40	21,20 ± 0,13 ^a	22,58 ± 0,70 ^a	21,07 ± 0,69 ^a
Q50GX50	22,16 ± 0,38 ^a	22,03 ± 0,63 ^a	22,50 ± 0,14 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O teor de umidade dos filmes oscilou entre 18,65% e 22,16%. De acordo com a Tabela 6, os filmes Q100GX0 e Q90GX10 apresentaram um menor teor de

umidade. Na literatura é possível encontrar valores semelhantes ao deste trabalho, Ge et al. (2015), ao desenvolverem filmes compósitos de gelatina com dialdeído de goma xantana e montmorilonita, reportaram teores de umidade entre 16 e 24%. Leceta et al. (2013a), ao estudarem filmes à base de quitosana, observaram teores de umidade entre 15,70 a 21,57%. Casariego et al. (2009), ao avaliarem filmes de quitosana com nanopartículas de argila em diferentes concentrações, encontraram teores de umidade entre 11,33 e 26,54%. Ziani et al. (2008) estudaram o efeito da presença de glicerol e Tween 20 sobre as propriedades químicas e físicas dos filmes de quitosana com diferentes graus de desacetilação e verificaram teores de umidade entre 17,4 e 30,7%.

A adição de goma xantana nos filmes de quitosana não afetou a solubilidade dos filmes em água e em ácido (Tabela 6). Os filmes de quitosana apresentaram uma solubilidade em água em torno de 22%, o que foi muito próximo dos valores relatados por Ojagh et al. (2010), que estudaram filmes a base de quitosana e óleo essencial de canela, e encontraram solubilidade em água de 23,20%. Guo et al. (2014) ao estudarem filmes à base de gelatina oxidado de goma xantana com periodato reportaram valores de solubilidade em água entre 14,8 a 16,9% e 19 e 22%, respectivamente. Segundo Leuangsukrerk et al. (2014) a baixa solubilidade dos filmes em água é uma propriedade desejável em filmes pois favorece a integridade global e resistência à água destes materiais, sendo também um fator importante que determina a biodegradabilidade de películas quando usadas como materiais de embalagens. Du e Hsieh (2007) reportaram que a solubilidade dos filmes de quitosana está associada com a cristalinidade da amostra, uma cristalinidade elevada contribui para uma menor solubilidade em água enquanto a baixa solubilidade da quitosana está relacionada com sua estrutura parcialmente cristalina.

4.3.7 Parâmetros de cor e opacidade dos filmes

As propriedades de cor e opacidade dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana.

Filmes	L*	a*	b*	Opacidade (%)
Q100GX0	90,51 ± 0,44 ^b	-2,29 ± 0,12 ^f	19,23 ± 0,77 ^a	8,65 ± 0,40 ^d
Q90GX10	90,53 ± 0,40 ^b	-1,77 ± 0,12 ^e	17,19 ± 0,58 ^b	10,42 ± 0,28 ^c
Q80GX20	90,56 ± 0,04 ^b	-1,68 ± 0,06 ^{cd}	16,32 ± 0,24 ^{bc}	11,17 ± 0,27 ^b
Q70GX30	91,09 ± 0,09 ^b	-1,53 ± 0,06 ^{bc}	15,42 ± 0,22 ^d	11,46 ± 0,06 ^{ab}
Q60GX40	91,83 ± 0,28 ^a	-1,39 ± 0,08 ^{ab}	13,91 ± 0,53 ^e	11,69 ± 0,17 ^a
Q50GX50	92,10 ± 0,16 ^a	-1,34 ± 0,05 ^a	12,71 ± 0,47 ^f	11,30 ± 0,17 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A incorporação de goma xantana em filmes de quitosana aumentou os parâmetros de luminosidade L* e de cor a* (Tabela 7), indicando que a adição deste polímero em filmes de quitosana aumenta a claridade e reduz a cor verde. O aumento dos valores do parâmetro b* indicam a predominância da cor amarela nos filmes de quitosana, o que foi constatado por Souza et al. (2009) ao avaliarem o efeito de campos elétricos moderados em filmes de quitosana. O aumento o teor da goma xantana reduziu o parâmetro de cor b* dos filmes. O filme sem adição de goma xantana apresentou a menor opacidade quando comparado com os demais filmes. Estes resultados sugerem que a incorporação de goma xantana diminuiu a transparência dos filmes de quitosana. Cuq et al.(1996) relataram que a transparência é uma propriedade importante para os filmes, uma vez que o consumidor deseja ver claramente o aspecto do produto que o filme irá cobrir. A opacidade é uma medida estabelecida da transparência de um filme, um maior valor de opacidade significa uma transparência menor (CASARIEGO et al., 2009). Casariego et al. (2009) ao estudarem filmes de quitosana incorporado com nanoargila com diferentes teores, encontraram resultados similares ao nosso estudo para os parâmetros L* (91,02), b* (12,76) e opacidade (8,23-11,28%).

4.3.8 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água

Os dados de espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de quitosana incorporado de goma xantana.

Filmes	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Elongação (%)	PVA (g.m ⁻¹ .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)
Q100GX0	0,098 ± 0,003 ^a	8,78 ± 0,52 ^e	53,14 ± 1,21 ^a	1,40x10 ⁻¹⁰ ± 4,89 x10 ^{-12a}
Q90GX10	0,101 ± 0,004 ^a	9,67 ± 0,26 ^d	30,10 ± 0,41 ^b	1,31x10 ⁻¹⁰ ± 8,53x10 ^{-12a}
Q80GX20	0,097 ± 0,002 ^a	12,81 ± 0,20 ^c	26,49 ± 0,49 ^c	1,35x10 ⁻¹⁰ ± 9,66x10 ^{-12a}
Q70GX30	0,103 ± 0,002 ^a	14,26 ± 0,04 ^b	24,89 ± 0,93 ^{cd}	1,40x10 ⁻¹⁰ ± 3.43x10 ^{-12a}
Q60GX40	0,102 ± 0,001 ^a	14,74 ± 0,33 ^b	23,90 ± 1,00 ^{cd}	1,37x10 ⁻¹⁰ ± 7.72x10 ^{-12a}
Q50GX50	0,103 ± 0,002 ^a	17,01 ± 0,34 ^a	23,48 ± 0,42 ^d	1,41x10 ⁻¹⁰ ± 9.22x10 ^{-12a}

Letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A adição de goma xantana nos filmes de quitosana aumentou a resistência à tração e reduziu a elongação dos filmes (Tabela 8). As propriedades mecânicas dos filmes podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como características da matéria prima, concentração dos constituintes, forma de processamento, dentre outros. Park et al. (2002) relataram que a resistência à tração de filmes de quitosana aumentaram com o aumento da massa molecular. Segundo Chen et al. (1994) e Ziani et al.(2008), o aumento dos valores de resistência à tração e elongação de filmes de quitosana estão relacionados com o grau de desacetilação da amostra e a cristalinidade dos filmes. Em geral, a cristalinidade dos filmes está relacionada com o aumento das forças intermoleculares, aumentando assim a rigidez e a fragilidade da película (CERVERA et al., 2004). Ziani et al. (2008) ainda relataram que o maior grau de desacetilação da quitosana resulta no aumento da mobilidade das cadeias que por sua vez está relacionado com a formação mais fácil de ligações de hidrogênio.

Conforme observado pelos resultados da resistência à tração e alongação, o filme Q100GX0 não é adequado para suportar alimentos pesados em embalagens, uma vez que o filme se deforma significativamente antes de sofrer ruptura. No entanto, a adição de goma xantana aumentou a resistência à tração e reduziu significativamente a elongação. A adição de goma xantana poderia resolver

parcialmente os baixos valores de resistência à tração e altos valores de alongação dos filmes de quitosana, permitindo a produção de um material adequado para a embalagem de alimentos. A melhoria nas propriedades mecânicas destes filmes com goma xantana é provavelmente devido a interações eletrostáticas fortes, como mencionado anteriormente. Estas interações entre os biopolímeros reduzem a mobilidade macromolecular, evitando o deslizamento das cadeias umas sobre as outras.

Na literatura é possível encontrar diversos valores para os parâmetros de propriedades mecânicas de filmes à base de quitosana. Os valores encontrados para os parâmetros das propriedades mecânicas deste estudo foram similares aos relatados por Shariatnia e Fazli (2015), Leceta et al. (2013a).

A permeabilidade ao vapor de água é uma propriedade bastante estudada em filmes biodegradáveis, principalmente devido as reações de deterioração nos alimentos (MARTINS et al., 2012). A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana adicionados de goma xantana em diferentes teores variou entre $1,31 \times 10^{-10}$ e $1,41 \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$. Estes valores foram medidos no quarto dia e não apresentaram diferença significativa, como mostrado na Tabela 8, o que indica que a adição da goma xantana não afetou este parâmetro. Vários fatores, tais como a espessura do filme, sensibilidade à água, cristalinidade, tamanho dos poros das películas e a presença de aditivos podem afetar a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana (GONTARD et al., 1994). Neste estudo, observamos que a adição de goma xantana não afetou a permeabilidade ao vapor de água. Contudo, as propriedades mecânicas dos filmes foram significativamente melhoradas.

4.4 Conclusão

Filmes de quitosana contendo goma xantana foram produzidos com sucesso. No entanto, as propriedades térmicas, mecânicas, físicas, ópticas e estruturais dos filmes foram significativamente alteradas com a adição de goma xantana. Filmes com propriedades mecânicas melhoradas, tais como maior resistência à tração e baixo alongação foram obtidos. A elevada resistência à tração é um resultado desejável para embalagens flexíveis, uma vez que permite a produção de um material mais resistente para a embalagens de alimentos. Neste estudo, observou-se que a adição de goma xantana não reduziu o teor de umidade, solubilidade,

permeabilidade ao vapor de água dos filmes, o que seria muito importante para o seu uso como materiais de embalagem para alimentos. Novos estudos devem ser realizados para avaliar o potencial desses polímeros como material de embalagem.

5 Capítulo 3 - Filmes biodegradáveis à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de pescado

Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e avaliar suas propriedades antioxidantes, mecânicas, físicas, estruturais, morfológicas, térmicas, ópticas e de barreira. A mistura de goma xantana e hidrolisado promoveram algumas alterações nos filmes de quitosana. A adição de goma xantana aumentou a resistência à tração e alterou os parâmetros de cor dos filmes. Por outro lado, a adição de hidrolisado proteico de corvina propiciou uma significativa atividade antioxidante aos filmes, no entanto, maiores teores de hidrolisado tendem aumentar a umidade e diminuir a resistência dos mesmos. Todos os filmes apresentaram uma estrutura homogênea, sem separação de fases e livres de fissuras. Não foram observadas diferenças significativas quanto à solubilidade e permeabilidade ao vapor de água nos filmes estudados.

Palavras-chave: quitosana; goma xantana; hidrolisado proteico; atividade antioxidante.

5.1 Introdução

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina, obtida pela desacetilação parcial da quitina, em que os grupos acetamidas das unidades acetil-glicosamino da quitina são convertidos em grupos amino (MILES et al., 2016). A quitosana é um biopolímero que nos últimos anos vem ganhando interesse da comunidade científica devido ao seu potencial para substituir os materiais de embalagens plásticas convencionais. Os filmes produzidos a partir desse polímero possuem propriedades atrativas como biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas, baixa permeabilidade seletiva de gases (CO_2 e O_2), boa aparência, atoxicidade, não-poluinte, estrutura semi-cristalina e baixo custo (ELSABEE e ABDOL, 2013; XU et al., 2005). No entanto, possuem fracas propriedades mecânica e de barreira ao vapor de água (RUBENTHEREN et al., 2016).

Uma forma de melhorar as propriedades dos filmes biodegradáveis consiste em utilizar misturas de polímeros (SHAHBAZI et al., 2016) e aditivos. Vários autores ao estudarem misturas de polímeros, constataram melhorias nas propriedades dos filmes. Zhu et al. (2014), ao avaliarem filmes comestíveis elaborados a partir de dois polissacarídeos diferentes (carboximetil-gelano e pululano), constataram que as interações poliméricas melhoraram os parâmetros mecânicos, aumentando a hidrofobicidade da superfície e diminuindo a permeabilidade ao vapor de água. Miles et al. (2016) também ao estudarem filmes a base de quitosana e N-acetilcisteína, reportaram que as interações destes dois polímeros melhoraram a resistência à tração dos filmes.

A goma xantana é um polímero promissor a ser adicionado em filmes comestíveis por ser considerada um produto seguro, biodegradável, capaz de formar uma matriz coesa e contínua com propriedades físicas e químicas uniformes, sendo altamente estável em ampla faixa de pH e temperatura (FITZPATRICK et al., 2013; VEIGA-SANTOS et al., 2005; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; JANSSON et al., 1975). Além disso, o uso da goma xantana em filmes melhora as propriedades mecânicas e sensoriais (VEIGA-SANTOS et al., 2005; CHEN e NUSSINOVITCH, 2000). A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzido pela fermentação aeróbica submersa de cultura pura do gênero *Xanthomonas campestris*. É constituída por repetidas unidades pentassacarídicas de β -Dglicose unidas por

ligação 1-4, formando a cadeia principal. A cadeia lateral é composta de β -d-manose-1,4- β -d-ácido glicurônico 1,2- α -d-manose (FITZPATRICK et al., 2013).

Cortez-Vega et al. (2014) reportaram que as proteínas de pescado possuem propriedades importantes que podem promover o desenvolvimento de filmes, tais como a capacidade de formar redes, plasticidade, elasticidade e boa barreira ao oxigênio. Nalinanon et al. (2011) relataram que os hidrolisados enzimáticos de pescados são considerados fontes potenciais de peptídeos funcionais com propriedades antioxidantes.

A corvina (*Micropogonias furnieri*) se destaca por apresentar grande volume de produção no sul do Brasil, baixo custo e disponibilidade o ano todo. A literatura traz vários estudos com filmes biodegradáveis em que a importância do uso de misturas de polímeros é claramente demonstrada. Este estudo tem como objetivo avaliar filmes a base de quitosana, goma xantana e hidrolisado de proteínas de peixe nas suas propriedades antioxidantes, mecânicas, morfológicas, ópticas, termogravimétricas, físico-químicas, bem como propriedades de barreira ao vapor de água.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Material

A quitosana, proveniente da empresa Polymar Ciência e Nutrição S/A, Fortaleza-CE, Brasil, possui as seguintes características: granulometria de 80 mesh, densidade aparente de 0,36 g/mL, pH de 8,10, cinzas totais de 0,89%, viscosidade de 199,5 cps a 20 °C e grau de desacetilação de 86,7%. A goma xantana foi doada pela empresa CP Kelco Brasil S.A, Limeira-SP, Brasil, e apresenta as seguintes características: tamanho de partícula de 180 μ m, pH 6,3, teor de piruvato de 9,35%, teor de acetil de 6,18% e umidade de 11%. O ácido acético e o glicerol foram obtidos da Synth[®]. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2.2 Preparação do hidrolisado proteico de corvina

O hidrolisado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) foi preparado de acordo com Zavareze et al. (2014), com adaptações. Nesse sentido os filés de

corvina foram triturados e homogeneizados com água destilada na proporção de 1:6 (m/v), aquecidos a 80 °C por 20 min, seguindo as condições de hidrólise: proporção de enzima/proteína 2/100 (m/m); pH igual a 8; temperatura de 50 °C; agitação de 300 rpm e tempo de reação de 4 h.

5.2.3 Caracterização dos hidrolisados

5.2.3.1 Grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise é definido como o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}) (ADLER-NISSEN, 1985). Para a maioria das proteínas, h_{total} corresponde a 8 mols equiv/kg de proteína, estimado com base na composição de aminoácidos. O GH foi calculado conforme a Equação 7.

$$GH = \frac{B \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Onde, B é o volume (mL) de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante; N_b é a concentração molar da base; MP é a massa de proteína (g); α é o grau de dissociação; h_{total} é o número total de ligações peptídica antes da reação.

5.2.3.2 Composição proximal

As composições proximais da matéria-prima e dos hidrolisados foram avaliadas de acordo com a metodologia da AOAC (2000). O teor de umidade foi determinado em estufa a 105 °C até massa constante (método gravimétrico nº 950.46); o teor de proteínas foi determinado através da quantificação do nitrogênio total da amostra pelo método Kjeldahl usando fator de conversão de 6,25 (método de Kjeldahl nº 928.08); o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet (método de Soxhlet nº 960.39) o teor de cinzas foi determinado em mufla entre 500 e 600 °C (método gravimétrico nº 920.153). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos hidrolisados foi avaliada pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH, conforme descrito por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. A solução do composto radicalar foi preparada dissolvendo 2,4 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Dessa forma, preparou-se uma solução estoque, a qual foi armazenada sob refrigeração até o momento da análise. A solução de trabalho de DPPH foi ajustada para uma absorbância em torno de 0,97 com adição de metanol. Em seguida, misturou-se 3,9 mL de solução de trabalho de DPPH com 100 µL de amostra. A solução foi homogeneizada durante um minuto em vórtice (Phoenix, AP-56) e mantida no escuro durante 24 h. Após este período realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Jenway, 6700 UV-Vis), no comprimento de onda de 517 nm. A captura do radical livre ABTS foi realizada conforme a metodologia de Re et al. (1999).

5.2.4 Elaboração dos filmes

Os filmes foram elaborados utilizando a técnica de *casting*, conforme metodologia descrita por Araujo-Farro et al. (2010), com algumas modificações. Filmes contendo 100/0/0; 50/50/0; 50/50/0,25; 50/50/0,50 e 50/50/0,75 (m/m/m) quitosana/xantana/hidrolisado foram preparados. Todas as soluções foram preparadas utilizando 0,75% de quitosana e 0,75% de goma xantana (m/v), excepto 100/0/0 (quitosana 1,5%, m/v). O hidrolisado de corvina foi adicionado nas formulações contendo quitosana e goma de xantana como descrito anteriormente.

As soluções de goma xantana foram preparadas por adição lenta do pó em 50 mL de água destilada sob agitação constante em um agitador magnético à temperatura ambiente durante 12 h. O pó de quitosana foi disperso em 50 mL de água destilada contendo 1% (v/v) de ácido acético por meio de agitação suave em temperatura ambiente até dissolução completa. Conforme as formulações descritas acima, as dispersões de goma xantana e quitosana foram misturadas, adicionadas de glicerol (Synth[®]) nos teores de 0,30 g de glicerol/g de polímeros. A dispersão foi submetida à agitação em Ultra-Turrax (Tecnal, Turratec TE102) a 20.000 rpm por 10 minutos para completa homogeneização. Na sequência, as soluções filmogênicas foram espalhadas (25 g) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais foram

colocadas em estufa com circulação de ar a 38° C por 18 horas. Após a secagem, os filmes foram armazenados adequadamente por 48 horas até o início das análises.

5.2.5 Caracterização dos filmes

5.2.5.1 Grupos funcionais

Os espectros de infravermelho das amostras de filmes foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu, modelo Affinity-1 (Japão), acoplado a um acessório de amostragem por Reflexão Total Atenuada (ATR), modelo Miracle A, Pike Technologies. As análises foram realizadas em intervalos de 4000 a 700 cm^{-1} com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Foram acumuladas 32 varreduras para cada espectro, com resolução de 4 cm^{-1} .

5.2.5.2 Propriedades termogravimétricas

As propriedades termogravimétricas dos filmes foram avaliadas utilizando um analisador termogravimétrico (Shimadzu, modelo DTG-60, Kyoto, Japão). Uma amostra com aproximadamente 4-6 mg foi aquecida em cadinho de platina a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, no intervalo de temperatura entre 30 e 900 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

5.2.5.3 Padrão de difração de raios-X

Os padrões de difração de raios-X foram obtidos através de um difractômetro de raios-X (D8 ADVANCE/DAVINCI, Alemanha) utilizando voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA em tubo de cobre (radiação Cu K α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Os padrões de difração foram obtidos à temperatura ambiente e intervalo de ângulo de 5 a 120°.

5.2.5.4 Morfologia

A morfologia dos filmes foi avaliada através das imagens de microscopia eletrônica de varredura (JEOL, JSM-6060, Tokyo, Japão), operado a 10 kV. As amostras foram recobertas com ouro e fotografadas com uma ampliação de 700 \times .

Os filmes foram cortados em pedaços pequenos, imersos e quebrados em nitrogênio líquido.

5.2.5.5 Umidade, espessura e solubilidade em água

O teor de umidade dos filmes foi avaliado em estufa a 105 °C até massa constante (AOAC, 1995). A espessura dos filmes foi medida em micrômetro digital (INSIZE). A solubilidade em água foi medida seguindo a metodologia descrita por Gontard et al. (1994), com algumas modificações. As amostras de filmes com um diâmetro de 2 cm foram secas em estufa com circulação de ar a 105 °C durante 24 h. As amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e agitada em *shaker* (Certomat) a 175 rpm e temperatura ambiente por 24 h. As amostras dos filmes foram removidas da água e secas sob as mesmas condições descritas anteriormente. A percentagem de solubilidade das películas foi calculada utilizando a Equação 8.

$$S(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Onde, S é a solubilidade em água (%); m_i é a massa seca inicial da amostra (g); m_f é a massa seca final da amostra (g).

5.2.5.6 Parâmetros de cor

Os parâmetros de cor dos filmes foram obtidos utilizando um colorímetro (Minolta, CR 400, Osaka, Japão). A cor foi obtida pelo sistema CIEL*a*b e a opacidade (Y) foi calculada seguindo a metodologia de Hunterlab (1997), avaliando a razão do filme sobreposto sobre ao padrão preto (Y_p) pelo filme sobreposto ao padrão branco (Y_b), conforme a Equação 9:

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad \text{Equação (9)}$$

5.2.5.7 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

As propriedades mecânicas de resistência à tração e alongação foram determinadas através de um texturômetro (Texture Analyser TA.XT plus, Stable Micro Systems), de acordo com o método ATM D 882 (ASTM, 2000), com separação inicial de 50 mm e velocidade do probe de 1 mm/s. As dimensões dos filmes foram de 8,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A resistência à tração foi determinada através da Equação 10 e a alongação (E) foi calculada utilizando a Equação 11.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação (10)}$$

Onde, RT é a resistência à tração (MPa); F_m é a força máxima no momento da ruptura (N); A é a área da secção transversal do filme (m²);

$$E = \frac{d_r - d_o}{d_o} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

Onde, E é a alongação (%); d_o é a separação inicial entre as garras (cm); d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada gravimetricamente pelo método padrão da American Society for Testing and Materials E-96-95 (ASTM, 1995), com algumas modificações. As amostras de filmes foram cuidadosamente alocadas e lacradas sobre células apropriadas contendo CaCl₂ (0% HR). Em seguida, as células foram mantidas dentro de um dessecador com umidade controlada até atingir a estabilidade. A fim de manter o controle da umidade (75% RH) e a temperatura ambiente (25 °C) utilizou-se uma solução saturada de NaCl. A massa das células foi, então, medidas a cada 24 h. A permeabilidade dos filmes foi calculada conforme a Equação 12.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \frac{L}{A \Delta P} \quad \text{Equação (12)}$$

Onde, PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹); ΔW é o ganho de massa pela célula (g); L é a espessura inicial da película (m); t é o tempo de

armazenamento (s); A é a área do filme exposto (m^2); ΔP é a diferença de pressão parcial (Pa).

5.2.5.8 Atividade antioxidante dos filmes adicionados de hidrolisado

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi medido conforme descrito anteriormente por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. Enquanto a captura do radical livre ABTS foi realizada conforme a metodologia de Re et al. (1999).

5.2.5.9 Análise estatística

A espessura dos filmes foi obtida pela média de sete medições em diferentes pontos do filme. A umidade, solubilidade em água, parâmetros de cor, opacidade, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água foram obtidas a partir da média de três análises. Estes resultados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Caracterização do hidrolisado proteico de corvina

A composição química do músculo de corvina (*Micropogonias furnieri*) mostrou 79,3% de umidade, 14,9% de proteína, 1,2% de gordura e 0,8% de cinzas. O hidrolisado proteico apresentou as seguintes características: grau de hidrólise de 26,7%, teor de umidade de 4,14%, proteínas 80,45%, lipídios 4,06%, cinzas 10,53%, atividade antioxidante 97% (captura do radical livre ABTS) e 48% (capacidade de sequestro do radical livre DPPH).

5.3.2 Grupos Funcionais

Os espectros dos filmes são mostrados na Figura 12. Os filmes foram analisados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, a fim de elucidar as interações entre quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico.

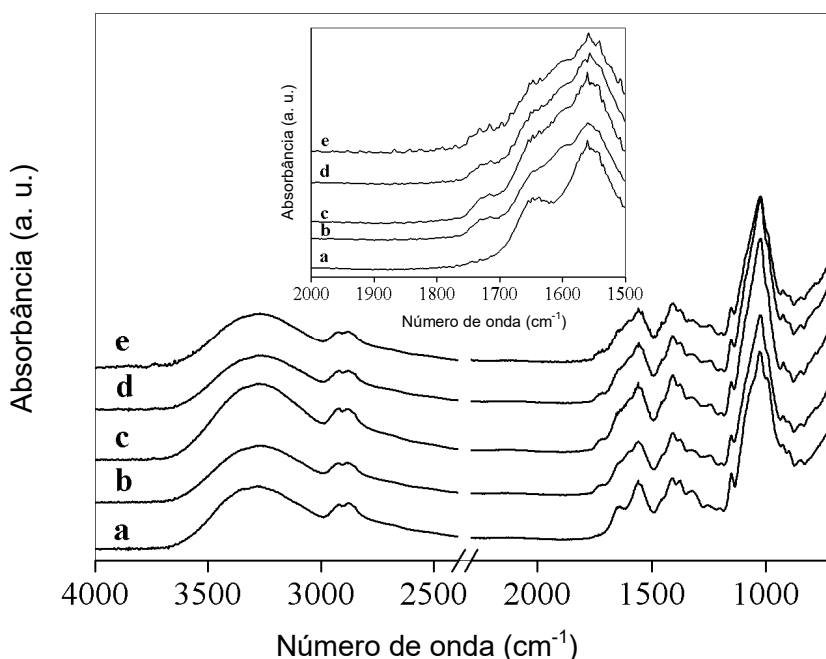


Figura 12. Espectros infravermelho dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e).

O espectro do filme 100/0/0 (a) mostra uma banda larga entre 3700 e 3000 cm^{-1} , associada aos modos de estiramento OH da quitosana e do glicerol envolvidos em uma extensa ligação de hidrogênio. Os modos de estiramento NH da quitosana deveriam ser observados na mesma região dos modos de estiramento OH. Entretanto, os modos de vibração NH estão provavelmente sobrepostos por modos de estiramento OH.

De acordo com Rubentheren et al. (2016), os modos vibracionais OH e NH são observados na mesma região neste trabalho. As bandas entre 3000 e 2800 cm^{-1} podem ser atribuídas a modos de estiramento CH assimétricos e simétricos dos componentes do filme. O espectro do filme 100/0/0 (a) apresenta bandas características da quitosana em 1638, 1555 e 1322 cm^{-1} , que podem ser atribuídas aos modos de estiramento C=O (amida I), modos de deformação NH (amida II) e modos de deformação CN (amida III), respectivamente. Leceta et al. (2013b) observaram estes modos vibracionais em 1650, 1558 e 1320 cm^{-1} , respectivamente.

A banda em 1376 cm^{-1} é atribuída a modos de deformação CH de CH_3 dos grupos acetamida, o que mostra que a quitosana utilizada neste trabalho não foi completamente desacetilada. A banda de absorção em 1027 cm^{-1} é atribuída aos modos de estiramento CO dos grupos hidroxila de álcoois. Fernandez-Saiz et al.

(2009) observaram modos de deformação CH e de estiramento CO em 1378 e 1050 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros dos filmes contendo goma xantana e teores crescentes de hidrolisado (b→e) também mostram as mesmas bandas descritas acima: modos de estiramento OH e CH, bandas de amida (I, II, III), modos de deformação CH e modos de estiramento CO. No entanto, a região espectral entre as bandas amida I e amida II, entre 1800 e 1500 cm^{-1} (na caixa), é particularmente interessante no nosso estudo. Pode-se observar muitos modos vibracionais adicionais nessa região, o que pode ser atribuído aos modos vibracionais do hidrolisado proteico e de acetato, piruvato, ácido glicurônico presentes na goma xantana.

Os grupos funcionais da quitosana são perturbados por grupos funcionais do hidrolisado de proteína e da goma xantana. Isso resulta em uma coalescência de modos vibracionais mostrados nos espectros e em um alargamento da banda. Horn et al. (2015) relataram que a reação de complexação entre quitosana e goma xantana ocorre devido às cargas opostas presentes nos biopolímeros, grupos NH_3^+ da quitosana e grupos COO^- da goma xantana. A interação entre as cadeias de polímeros dá origem a uma nova estrutura e o processo de complexação aumenta a estabilidade mecânica e química do filme. O hidrolisado também tem grupos funcionais, que podem se complexar com os outros componentes.

5.3.3 Propriedades termogravimétricas dos filmes

Análise termogravimétrica é uma técnica na qual a variação de massa de uma substância (Δm) é medida quando esta é submetida a uma programação controlada de temperatura. Dessa forma, a análise termogravimétrica possibilita conhecer a faixa de temperatura em que a amostra adquire uma composição química fixa, a temperatura em que se decompõe e o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, dentre outras (HAINES, 1995). Os termogramas dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de peixe são mostrados na Figura 13. A caixa dentro da Figura 13 mostra os termogramas dos polímeros puros (quitosana, goma xantana) e do hidrolisado.

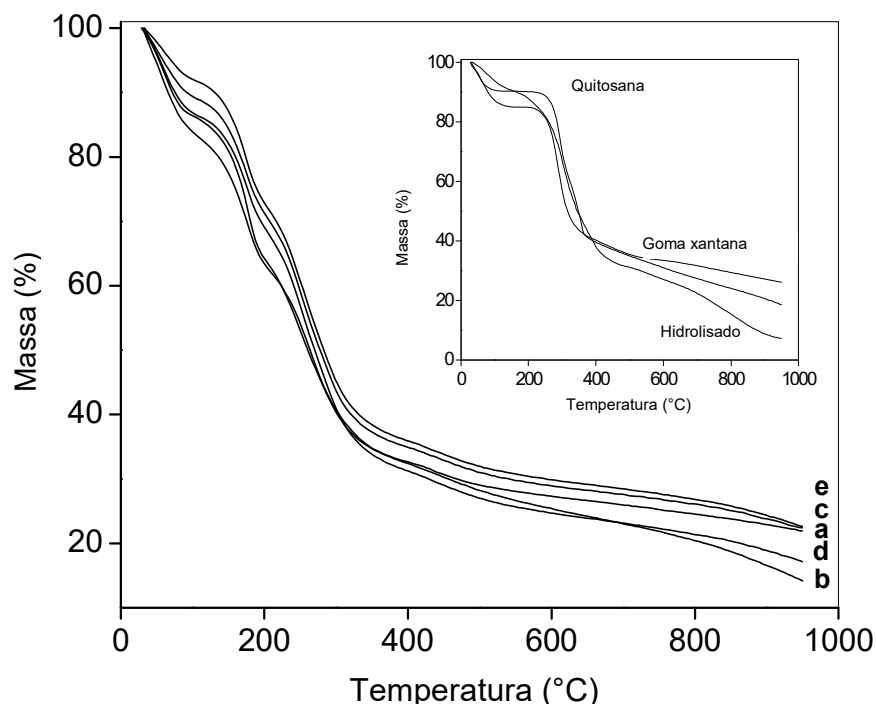


Figura 13. Termogramas dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e). Dentro da caixa estão os termogramas dos polímeros puros.

Todos os filmes na Figura 13 apresentam uma perda de massa até 120 °C, o que pode estar relacionado com a água adsorvida nos filmes. As temperaturas de decomposição térmica da matéria orgânica podem ser observadas a partir de 120 °C e não há variações significativas entre o filme 100/0/0 (a) e os filmes de quitosana contendo goma xantana e hidrolisado (b → e). Além disso, a perda de massa de matéria orgânica dos filmes ocorre em mais de uma fase. Por outro lado, os pós de quitosana e goma xantana (na caixa) mostram altas temperaturas de decomposição em apenas uma fase, 240 e 220 °C, respectivamente. A decomposição térmica do hidrolisado (na caixa) ocorre continuamente desde baixas temperaturas.

A adição de goma xantana e diferentes teores de hidrolisado nos filmes não influenciaram o processo de decomposição. No entanto, pode-se observar que a adição de glicerol, goma xantana e hidrolisado produz filmes com mais de um estágio de decomposição térmica da matéria orgânica, o que sugere interações químicas entre os componentes. Além disso, os filmes se decompõem a

temperaturas mais baixas, provavelmente devido à presença de componentes de menor massa molecular, como glicerol e hidrolisado. Li et al. (2006) reportaram que a estabilidade térmica dos filmes é determinada principalmente pelos seus domínios cristalinos e interações por ligações de hidrogênio.

5.3.4 Padrão de difração de raios-X

Os difratogramas dos filmes e biopolímeros puros (dentro da caixa) estão mostrados na Figura 14. Todos os filmes apresentam difratogramas semelhantes com picos largos entre 10 e 25°. A diminuição da intensidade e o alargamento do pico centrado em 20° sugere uma diminuição da cristalinidade da quitosana em filmes quando comparado com o pó de quitosana (na caixa), que tem dois picos principais, centrados em 10 e 20 °.

Wu et al. (2013) reportaram que o pico próximo de 10° indica uma estrutura cristalina hidratada da quitosana, já o pico próximo a 20° está relacionado com uma estrutura mais cristalina que a anterior para a quitosana. A quitosana é considerada um material semicristalino, cuja fase cristalina está dispensa na fase amorfa. A semi cristalinidade se deve ao balanço de energia livre associado a formação das ligações de hidrogênio na quitosana (COSTA-JÚNIOR et al., 2009).

A adição de glicerol/goma xantana/hidrolisado à quitosana resulta na atração intermolecular e na reação de complexação entre os componentes, conforme discutido na seção de grupos funcionais. Isto causa a destruição do empacotamento das cadeias na quitosana, o que é necessário para a formação regular de cristalitos (Wu et al., 2013).

Na Figura 14 a diminuição da cristalinidade pode ser observada pela diminuição da intensidade dos picos em 10 e 20°, e pelo alargamento do pico a 20°.

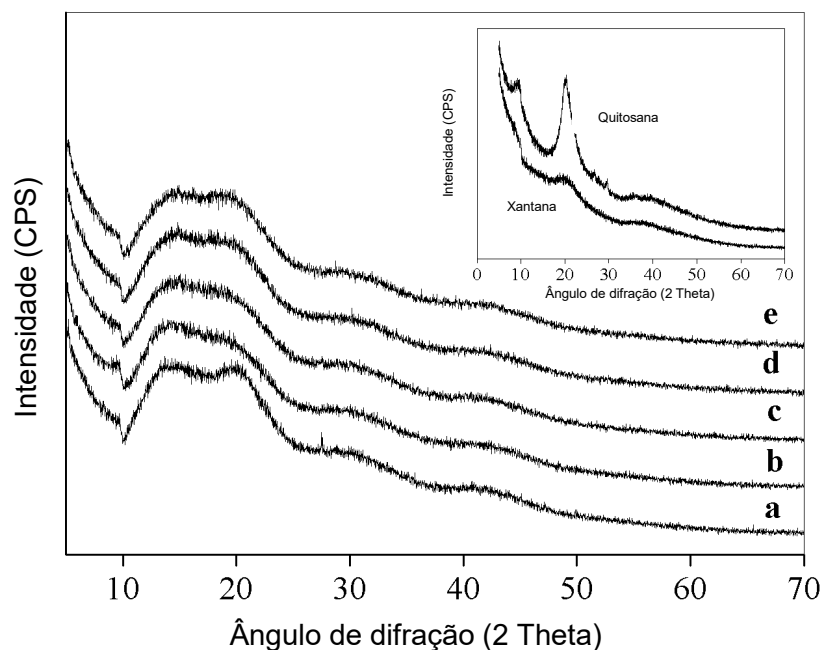


Figura 14. Difrátogramas de raios-X dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e)

Além disso, o pico em 15° também sugere uma nova organização das cadeias poliméricas. Deve notar-se que a adição de goma xantana e hidrolisado não afetou a organização quando os filmes foram comparados uns com os outros.

5.3.5 Morfologia dos filmes

A morfologia dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de corvina está apresentada na Figura 15.

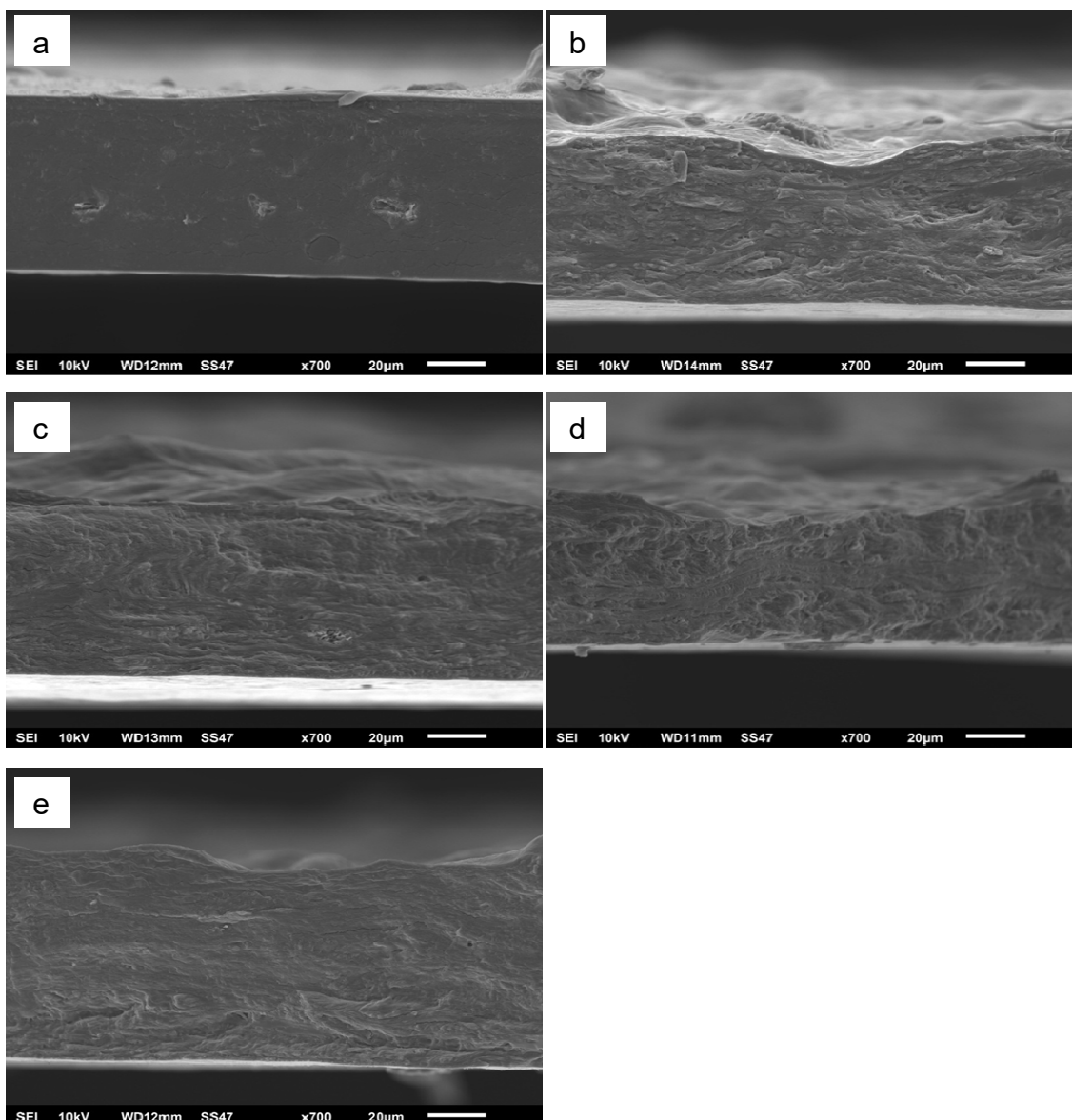


Figura 15. Micrografias da seção transversal dos filmes de quitosana/xantana/hidrolisado (m/m/m): 100/0/0 (a); 50/50/0 (b); 50/50/0,25 (c); 50/50/0,50 (d) e 50/50/0,75 (e).

De acordo com as imagens, observa-se que os filmes apresentaram uma estrutura homogênea, sem separação de fases e livre de fissuras, isto sugere que os polímeros interagiram bem entre si formando uma matriz coesa e contínua. Os filmes (b→e) apresentaram uma matriz rugosa diferente do filme (a) que apresentou um aspecto liso, essa diferença é atribuída à interação da goma xantana e quitosana na matriz dos filmes. Segundo Acosta et al. (2015), a microestrutura dos filmes depende das interações entre os componentes do filme e das condições de secagem. Assim,

a microestrutura do filme pode ser correlacionada com a suas propriedades de barreira, mecânicas e ópticas.

5.3.6 Teor de umidade, solubilidade em água e espessura dos filmes

Teor de umidade, solubilidade em água e espessura dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado enzimático estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Teor de umidade, solubilidade em água e espessura dos filmes à base de quitosana goma xantana e hidrolisado proteico.

Filmes (quitosana/xantana/hidrolisado, m/m/m)	Umidade (%)	Solubilidade (%)	Espessura (mm)
100/0/0	24,59 ± 0,58 ^a	19,50 ± 0,96 ^b	0,090 ± 0,005 ^a
50/50/0	22,11 ± 0,45 ^b	22,06 ± 0,61 ^a	0,091 ± 0,001 ^a
50/50/0,25	22,54 ± 0,68 ^b	22,44 ± 1,06 ^a	0,096 ± 0,002 ^a
50/50/0,50	22,72 ± 0,56 ^b	22,29 ± 0,50 ^a	0,094 ± 0,003 ^a
50/50/0,75	23,56 ± 0,45 ^{ab}	20,79 ± 0,93 ^{ab}	0,092 ± 0,005 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Leceta et al. (2013a) citam que o conhecimento do teor de umidade e matéria solúvel total de filmes é muito importante para aplicações em embalagens de alimentos. Assim os filmes utilizados na conservação de alimentos devem manter os níveis de umidade no interior do produto embalado.

Como mostra a Tabela 9, os teores de umidade das cinco formulações de filmes não sofreram grandes variações. O filme 100/0/0 apresentou o maior teor de umidade (24,59%) enquanto o filme contendo somente quitosana e goma xantana apresentou o menor teor (22,11%). Observa-se que ao aumentar o teor de hidrolisado proteico nas formulações ocorre um leve aumento da solubilidade. Ma et al. (2016), ao estudar filmes de quitosana com microemulsões de óleo de casca de canela e óleo de soja, encontraram teores de umidade similares ao referido estudo (14,17 a 26,46%). Casariego et al. (2009) ao avaliarem filmes de quitosana com nanopartículas de argila em diferentes concentrações, encontraram teores de umidade entre 11,33-26,54%.

A solubilidade dos filmes oscilou entre 19,50 e 22,44%, sendo observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre algumas formulações de filmes. Valores semelhantes foram reportados por Shahbazi et al. (2016) ao estudarem filmes a base de quitosana e carragena. Os mesmos autores ainda citam que filmes de quitosana tem baixa solubilidade em água, devido a quitosana possuir uma estrutura cristalina e rígida. Pérez-Gago et al. (1999) mencionaram que a solubilidade de filmes depende de alguns fatores, tais como a constituição dos filmes, conformação das cadeias e condição térmica.

De acordo com os resultados de espessura (Tabela 9) não houve diferença significativa entre as formulações dos filmes. A espessura dos filmes é uma medida bastante variável, uma vez que depende de vários fatores, tais como concentração da massa polimérica, hidrofiliabilidade do polímero, quantidade de solução filmogênica colocada na placa, temperatura e tempo de secagem.

5.3.7 Parâmetros de cor e opacidade dos filmes

As propriedades de cor e opacidade dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado estão apresentados na Tabela 10. O parâmetro L^* (luminosidade) varia do preto (0) ao branco (100); parâmetro a^* , do verde (-a) ao vermelho (+a) enquanto o parâmetro b^* , do azul (-b) ao amarelo (+b).

Tabela 10. Parâmetros de cor e opacidade dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico de corvina.

Filmes ^a (quitosana/xantana/hidrolisado, m/m/m)	L^*	a^*	b^*	Opacidade (%)
100/0/0	$87,52 \pm 0,41^c$	$-2,01 \pm 0,13^a$	$30,87 \pm 1,14^b$	$15,60 \pm 0,18^b$
50/50/0	$92,29 \pm 0,51^a$	$-1,87 \pm 0,12^a$	$17,36 \pm 0,46^a$	$17,29 \pm 0,23^a$
50/50/0,25	$90,45 \pm 0,54^b$	$-2,02 \pm 0,03^a$	$17,40 \pm 0,21^a$	$17,44 \pm 0,23^a$
50/50/0,50	$91,32 \pm 0,76^{ab}$	$-1,94 \pm 0,06^a$	$16,57 \pm 0,48^a$	$17,40 \pm 0,09^a$
50/50/0,75	$91,78 \pm 0,30^a$	$-1,99 \pm 0,08^a$	$17,73 \pm 0,70^a$	$17,44 \pm 0,12^a$

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Alemán et al. (2016) reportaram que as características ópticas como cor e opacidade são parâmetros muito importantes em filmes, uma vez que estes parâmetros podem influenciar a aparência geral de alimentos, principalmente quando considera-se um filme comestível. Os valores de L^* mostrados na Tabela 10, revelaram diferenças significativas, visto que o filme 100/0/0 apresentou os menores valores de L^* e de a^* , no entanto o filme 100/0/0 apresentou maior valor de b^* . Souza et al. (2009), ao avaliarem o efeito de campos elétricos moderados em filmes de quitosana, constataram aumento dos valores do parâmetro b^* , o que segundo estes autores indica a predominância da cor amarela nos filmes de quitosana. Para os filmes contendo goma xantana observa-se uma redução deste parâmetro.

Como mostrado na Tabela 10, observa-se que o teor de goma xantana aumentou significativamente a opacidade dos filmes, proporcionando maior barreira frente à incidência de luz. Casariego et al. (2009) citam que a opacidade é uma medida importante a ser determinada em filmes, uma vez que estabelece a transparência. Um maior valor de opacidade significa uma menor transparência. De acordo com Pucci e Shroff, (1986), o tamanho dos cristalitos influencia o brilho e a opacidade do material. Alemán et al. (2016) reportaram que a opacidade não está relacionada com a espessura dos filmes, neste aspecto, nosso estudo está coerente com estes autores uma vez que os filmes não apresentaram diferenças significativas para este parâmetro.

Quanto à incorporação de hidrolisados nos filmes, observa-se que estes nas concentrações e condições estudadas, não influenciou as características ópticas de cor e opacidade dos filmes à base de quitosana e goma xantana.

5.3.8 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água dos filmes

As propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado proteico.

Filmes (quitosana/xantana/hidrolisado, m/m/m)	Resistência à tração (MPa)	Elongação (%)	PVA (g.m ⁻¹ .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)
100/0/0	4,91 ± 0,91 ^c	23,94 ± 1,06 ^a	1,35x10 ⁻¹⁰ ± 9,99x10 ^{-12a}
50/50/0	14,07 ± 0,66 ^a	9,03 ± 0,62 ^b	1,26x10 ⁻¹⁰ ± 2,22x10 ^{-12a}
50/50/0,25	11,30 ± 0,32 ^b	9,89 ± 0,86 ^b	1,32x10 ⁻¹⁰ ± 5,07x10 ^{-12a}
50/50/0,50	12,19 ± 0,54 ^b	9,56 ± 0,50 ^b	1,33x10 ⁻¹⁰ ± 9,95x10 ^{-12a}
50/50/0,75	11,93 ± 0,94 ^b	9,19 ± 2,11 ^b	1,32x10 ⁻¹⁰ ± 5,88x10 ^{-12a}

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

De acordo com a Tabela 11, enfatiza-se que o filme 100/0/0 apresentou uma resistência a tração menor e uma elongação maior do que os filmes adicionados de goma xantana e hidrolisado proteico. Estes resultados sugerem que a incorporação de goma xantana nos filmes de quitosana levou a um aumento nas interações intermoleculares e, assim, na força coesiva dos filmes. Soazo et al. (2011) ao estudarem filmes de proteína de soro de leite e cera de abelha, observaram que os valores de resistência à tração diminuíram gradualmente com o aumento do teor de ceras. Segundo esses autores, a causa para a diminuição desse parâmetro é devido a uma ruptura na matriz contínua do biopolímero o que induz a uma estrutura de filme heterogêneo.

A adição de hidrolisado proteico proporcionou uma leve diminuição da resistência à tração nos filmes à base de quitosana e goma xantana (Tabela 11), possivelmente devido a formação e combinação de pontes dissulfeto, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio presentes nas proteínas que pode levar a fragilidade dos filmes (SOTHORNVIT e KROCHTA, 2001).

Ferreira et al. (2016) reportaram que os resultados de resistência a tração e elongação de filmes de quitosana são difíceis de comparar com os resultados encontrados na literatura por causa do grande número de variáveis envolvidas (composições diferentes, grau de acetilação, massa molecular, métodos de preparação da película e as condições de armazenamento). Suppakul et al. (2013)

relataram que as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana podem ser modificadas pelo teor de umidade do material, quando exposto a ambientes com umidade relativa mais elevada do que 60%. Assim, as moléculas de água absorvida pelo filme podem mudar a estrutura interna, modificando as propriedades mecânicas.

A permeabilidade ao vapor de água é uma propriedade importante a ser determinada em filmes à base de biopolímeros quando se deseja aplicar estes materiais em embalagens de alimentos, uma vez que as embalagens tem uma influência direta sobre a vida de prateleira de produtos alimentares. Filmes de polissacarídeos apresentam uma elevada permeabilidade ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica (FERREIRA et al., 2016). Neste estudo, os filmes foram armazenados num dessecador contendo sílica em gel durante 72 horas, estas condições possivelmente afetaram a resistência à tração e a elongação dos filmes de quitosana.

A permeabilidade ao vapor de água não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 11), sendo assim, a adição de goma xantana e hidrolisado proteico não influenciaram esta propriedade dos filmes.

5.3.9 Atividade antioxidante dos filmes adicionados de hidrolisado

Os testes de ABTS e DPPH foram conduzidos para verificar se o hidrolisado enzimático de corvina manteve sua capacidade antioxidante após incorporado na matriz dos filmes. O DPPH é um método utilizado para verificar a capacidade antioxidante uma vez que baseia em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, de coloração púrpura, que absorve no comprimento de onda de 515-517 nm. A ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\bullet$) reduz o DPPH, formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Outro método utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Este método é baseado na inibição, por antioxidantes, da absorbância do cátion radical $ABTS^+$ que tem um espectro de absorção característico de comprimento de onda longo com absorção máxima principal em 415 nm e absorções máximas secundárias

em 660, 734 e 820 nm, e que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (KUSKOSKI et al., 2005).

As porcentagens de inibições da oxidação obtida pelos métodos de ABTS e DPPH para os filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado enzimático estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Atividade antioxidante dos filmes à base de quitosana, goma xantana e hidrolisado enzimático obtida pelos métodos de ABTS e DPPH.

Filmes (Quitosana/xantana/hidrolisado, m/m/m)	ABTS (% inibição)	DPPH (% inibição)
100/0/0	8,04 ± 0,28 ^d	0,17 ± 0,10 ^d
50/50/0	7,98 ± 0,46 ^d	0,20 ± 0,06 ^d
50/50/0,25	51,58 ± 0,75 ^c	1,70 ± 0,14 ^c
50/50/0,50	59,31 ± 0,61 ^b	2,12 ± 0,10 ^b
50/50/0,75	61,75 ± 0,86 ^a	2,46 ± 0,16 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante dos filmes, tanto pela captura do radical DPPH quanto pela captura do radical ABTS, foi diretamente proporcional ao aumento do teor de hidrolisado enzimático (Tabela 12). É possível notar que as porcentagens de inibições dos filmes com hidrolisado enzimático apresentaram diferenças significativas pelos dois métodos variando entre 51,58 e 61,75% para ABTS e 1,70 e 2,46% para DPPH.

As propriedades antioxidantes de peptídeos são altamente influenciados pela massa molecular e a estrutura molecular. A maior parte dos peptídeos que exibem a atividade antioxidante foram aqueles com massa moleculares baixas (QIAN et al., 2008; SHEIH et al., 2009). As propriedades antioxidantes dependem de fatores intrínsecos como a composição do filme, a sua espessura e as técnicas de preparação. Assim, a incorporação de compostos adicionais aos filmes de quitosana pode alterar as suas propriedades (VALENCIA-CHAMORRO et al., 2011).

5.4 Conclusão

A quitosana pode ser misturada com goma xantana e hidrolisado enzimático de peixe para obter filmes com propriedades mecânicas e estabilidade química melhoradas. Os resultados de infravermelhos mostram que a incorporação de goma xantana e hidrolisado enzimático perturba os grupos amida da quitosana. As ligações de hidrogênio e a complexação química entre a quitosana, goma xantana e as cadeias de hidrolisados origina uma nova estrutura dos filmes com estabilidade química e resistência à tração superiores às dos filmes de quitosana.

A decomposição térmica de filmes não foi afetada pela adição de goma xantana e pelo conteúdo diferente de hidrolisado. Nesse sentido, observa-se que a adição de glicerol, goma xantana e hidrolisado produz filmes com mais de um estágio de decomposição térmica da matéria orgânica, provavelmente pela destruição da organização das cadeias de quitosana, como foi observado pela análise de DRX .

Apesar das diferenças na composição química, todos os filmes apresentaram aparência homogênea sem separação de fases e sem fissuras. O teor de umidade e solubilidade em água dos filmes não foram afetados significativamente pela adição de goma xantana e hidrolisado enzimático. Por outro lado, a adição de goma xantana afetou significativamente os parâmetros de cor e opacidade dos filmes quando comparados ao filme de quitosana sozinha, enquanto a incorporação de hidrolisados enzimáticos não alterou significativamente esses parâmetros ópticos.

Filmes de quitosana contendo goma xantana e teores crescentes de hidrolisado enzimático apresentaram resistência à tração maior e elongação menor do que o filme de quitosana. No entanto, a adição de hidrolisado de proteína proporcionou uma ligeira diminuição na resistência à tração quando comparada com o filme de quitosana contendo apenas goma xantana. A atividade antioxidante dos filmes foi diretamente proporcional à concentração de hidrolisado enzimático. Por conseguinte, o filme com maior teor de hidrolisado apresentou uma percentagem mais elevada de inibição pela captura dos radicais DPPH e ABTS. Estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial destes polímeros como materiais de embalagem.

6 Capítulo 4 - Aplicação de filmes à base de quitosana e goma xantana na conservação de filés de pescado refrigerado

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi determinar a eficiência de filmes à base de quitosana e goma xantana na conservação de filés de corvina mantidos sob refrigeração durante 9 dias. Avaliou-se a composição proximal, a perda de massa, cor, pH, N-BVT (Bases Voláteis Totais) e perfil microbiológico. Os filmes foram preparados com quitosana e goma xantana em proporções de massa variáveis 100:0, m:m (Q100GX0); 60:40, m:m (Q60GX40); 50:50, m:m (Q50GX50). Os resultados demonstraram que a combinação de quitosana e goma xantana proporcionaram melhorias na qualidade do pescado refrigerado, uma vez que reduziu as N-BVT e inibiu o crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp e coliformes a 45°C.

Palavras-chave: quitosana; goma xantana; filmes; pescado; propriedades antimicrobianas.

6.1 Introdução

As embalagens ativas provenientes de fontes naturais estão ganhando o interesse de pesquisadores e indústrias uma vez que além de fornecer proteção, segurança e boa aparência aos alimentos, devem ser ecologicamente corretas (ZEMPLIC et al., 2013). Os sistemas de embalagens ativas são baseados na incorporação de substâncias, com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, dentre outras, a fim de controlar as alterações indesejáveis na qualidade dos alimentos (SALGADO et al., 2011).

A quitosana é um polissacarídeo linear constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-D-glicosamina, obtida por desacetilação da quitina, que é o segundo polissacárido mais abundante encontrado na natureza depois da celulose. É considerada atóxica, biocompatível, biodegradável (ELSABEE e ABDOL, 2013) e apresenta propriedades antimicrobianas contra algumas bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras e bolores (CHEN et al., 1996; RAMEZANI et al., 2015).

Embora a quitosana seja citada na literatura como um dos polímeros potenciais para uso em embalagens biodegradáveis, este polímero apresenta algumas desvantagens, tais como, baixa resistência mecânica e alta solubilidade e permeabilidade ao vapor de água. Uma forma de melhorar estas propriedades está baseada em misturar quitosana com outros polímeros (BONILLA et al., 2014), como a goma xantana, amido, celulose e proteínas. A goma xantana é um produto seguro, biodegradável, capaz de formar uma matriz coesa, estável e contínua com propriedades físicas e químicas uniformes, além de promover melhorias na resistência mecânica quando misturada a outros polímeros (FITZPATRICK et al., 2013; VEIGA-SANTOS et al., 2005).

Na literatura existem poucos relatos sobre filmes de quitosana e goma xantana, no entanto, não foram encontradas publicações que mencionem aplicações destes para extensão da vida útil de pescado refrigerado. A corvina (*Micropogonias furnieri*) é considerada como uma das espécies de peixes economicamente importante, é encontrada em abundância no Oceano Atlântico (do Caribe até a Argentina) (ISAAC, 1988). O uso de embalagens com atividade antimicrobiana à base de quitosana pode ser uma maneira de preservar e estender a vida útil deste pescado, especialmente quando na forma filetada. Assim, o objetivo desta pesquisa

foi verificar o efeito de embalagens de filmes de quitosana e goma xantanana na conservação de filés de corvina embalados sob refrigeração durante nove dias.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Material

A corvina (*Micropogonias furnieri*) recém-capturada foi adquirida diretamente dos pescadores da Colônia Z3 - Pelotas - RS. A quitosana foi adquirida da empresa Polymar Ciência e Nutrição S/A, Fortaleza-CE, Brasil, possui as seguintes características: granulometria de 80 mesh, densidade aparente de 0,36 g/mL, pH de 8,10, cinzas totais de 0,89%, viscosidade de 199,5 cps a 20 °C e grau de desacetilação de 86,7%. A goma xantana foi doada pela empresa CP Kelco Brasil S.A, Limeira-SP, Brasil, e apresenta as seguintes características: tamanho de partícula 180 µm, pH 6,3, teor de piruvato de 9,35%, teor de acetil de 6,18% e umidade 11%.

6.2.2 Elaboração dos filmes e preparação das amostras

Os filmes foram elaborados utilizando a técnica de *casting*, conforme metodologia descrita por Araujo-Farro et al. (2010), com algumas modificações. Filmes foram preparados com quitosana e goma xantana em diferentes proporções de massa: 100:0, m:m (Q100GX0); 60:40, m:m (Q60GX40); 50:50, m:m (Q50GX50). A quantidade total de sólidos (quitosana e goma xantana) na solução filmogênica foi de 1,5 g por 100 mL de solução aquosa para todos os tratamentos, de acordo com a proporção de cada polímero.

As soluções de goma xantana foram preparadas por adição lenta do pó em 50 mL de água destilada sob agitação constante em um agitador magnético à temperatura ambiente durante 12 h. O pó de quitosana foi disperso em 50 mL água destilada contendo 1% (v/v) de ácido acético por meio de agitação suave em temperatura ambiente até à dissolução completa. As dispersões de goma xantana e quitosana foram misturadas, adicionadas de glicerol (P.A.) (Synth[®]) na proporção de 0,30 g de glicerol/g de polímeros e submetidas à agitação em Ultra-Turrax (Tecnal, Turratec TE102) a 20.000 rpm por 10 minutos para completa homogeneização. Na

sequência, as soluções filmogênicas foram espalhadas (25 g) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais foram colocadas em estufa com circulação de ar a 38 °C por 18 horas. Após a secagem, os filmes foram armazenados adequadamente por 48 horas.

Em seguida, os filmes foram confeccionados em pequenas embalagens (sacos) com a capacidade de comportar cerca de 20 g de filés de peixe. Assim, cada amostra embalada com filme foi colocada dentro de uma placa de petri. As placas de petri contendo as amostras foram armazenadas em BOD a 4 ± 1 °C durante 9 dias. Paralelamente, foi preparada uma amostra controle, nas mesmas condições de armazenamento, utilizando sacos de polietileno. As amostras foram avaliadas em dias alternados durante nove dias, (1, 3, 5, 7 e 9 dias), exceto a composição química (foi realizada somente no primeiro dia), cor e análise microbiológica (foram realizadas no primeiro e último dia de análise).

6.2.3 Caracterização dos filés

6.2.3.1 Composição proximal

A composição proximal da matéria-prima foi avaliada de acordo com a metodologia da AOAC (2000). O conteúdo de umidade foi determinado em estufa à 105 °C até massa constante (método gravimétrico nº 950.46); o teor de proteínas foi determinado através da quantificação do nitrogênio total da amostra pelo método Kjeldahl usando fator de conversão de 6,25 (método de Kjeldahl nº 928.08); o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet (método de Soxhlet nº 960.39) o teor de cinzas foi determinado em mufla a 500-600 °C (método gravimétrico nº 920.153). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.2.3.2 Perda de massa

A perda de massa foi obtida a partir da diferença entre a massa inicial dos filés embalados e a massa obtida ao final de cada tempo de armazenamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa (Equação 13).

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação (13)}$$

Onde, m_i é massa inicial e m_f é massa final.

6.2.3.3 Cor

Os parâmetros de cor instrumental dos filés de corvina foram avaliados no tempo inicial e final de armazenamento, utilizando-se colorímetro (Minolta Chromometer, CR 300), sistema CIE ($L^*a^*b^*$).

6.2.3.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

A análise de pH dos filés de corvina foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC (2000), onde 10 g de pescado triturado foi homogeneizado com 100 mL de água destilada.

6.2.3.5 Determinação de N-BVT (Bases Voláteis Totais)

As bases voláteis totais nos filés de corvina foram determinadas conforme a metodologia da AOAC (1990). O cálculo do N-BVT (mg N/100g) foi realizado conforme a Equação 14.

$$\frac{\text{N-BVT: } (V_{\text{HClgasto}} - V_{\text{HClbranco}}) * M_{\text{ácido}} * 14,01}{M} \quad \text{Equação (14)}$$

Onde, $V_{\text{HCl gasto}}$ é volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL); $V_{\text{HCl branco}}$ é volume de HCl gasto na titulação do branco (mL); $M_{\text{ácido}}$ é molaridade do HCl; M é massa da amostra (g).

6.2.3.6 Análises microbiológicas

Os filés de corvina com e sem filmes à base de quitosana e goma xantana foram avaliados quanto a detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp e coliformes a 45°C, segundo metodologia recomendada por APHA (2001).

6.2.3.7 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Composição proximal

A composição proximal (base úmida) dos filés de corvina foi: 75,85% \pm 0,55 de umidade; 18,71% \pm 0,21 de proteínas; 4,03% \pm 0,48 de lipídios e 1,00% \pm 0,55 de cinzas. A composição química do pescado pode variar em função do tipo de músculo, sexo, idade, época do ano, habitat e dieta entre outros fatores (Luzia et al., 2003). Cozzo-Siqueira et al. (2003) citam que o músculo do pescado pode conter de 60 a 85% de umidade, aproximadamente 20% de proteínas, de 1 a 2% de cinzas, de 0,3 a 1,0% de carboidratos e de 0,6 a 36% de lipídios.

Curcho et al. (2009) ao avaliarem a composição centesimal de corvina encontraram 77,9% de umidade, 19,6% de proteínas, 1,06% de cinzas e 1,46% de lipídios. Luzia et al., (2003) ao estudarem o perfil de lipídios de corvina, encontraram teores de lipídios diferentes para cada época do ano, sendo 0,6 % para o verão e 3,29% para o inverno.

6.3.2 Perda de massa

Valores de perda de massa dos filés de corvina embalados sem e com revestimentos à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias estão representados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de perda de massa dos filés de corvina embalados sem e com revestimentos à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.

Filmes	Perda de massa (%)			
	3° dia	5° dia	7° dia	9° dia
Controle	$0,11 \pm 0,19^{bB}$	$0,115 \pm 0,02^{bB}$	$0,19 \pm 0,03^{bA}$	$0,24 \pm 0,02^{bA}$
Q100GX0	$1,46 \pm 0,31^{aC}$	$2,18 \pm 0,51^{aBC}$	$3,68 \pm 0,34^{aAB}$	$4,01 \pm 0,64^{aA}$
Q60GX40	$1,32 \pm 0,47^{aB}$	$1,96 \pm 0,56^{aAB}$	$3,12 \pm 0,73^{aA}$	$3,58 \pm 0,79^{aA}$
Q50GX50	$1,60 \pm 0,61^{aB}$	$2,23 \pm 0,75^{aAB}$	$3,03 \pm 0,86^{aA}$	$3,42 \pm 0,88^{aA}$

^aLetras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com a Tabela 13, observa-se que houve um aumento da perda de massa dos filés no decorrer do armazenamento para todos os tratamentos. A perda foi significativamente menor no tratamento controle, com filme de polietileno. Entre os demais tratamentos não se verificou diferença significativa ($p \leq 0,05$); logo, a adição de goma xantana não melhorou a performance dos filmes. As maiores perdas foram verificadas a partir do sétimo dia de armazenamento.

Soares et al. (2015), ao estudarem o efeito de glazeamento e revestimento à base de quitosana na preservação de salmão congelado, verificaram que a perda de massa não apresentou diferença significativa ao longo de armazenamento, exceto no último tempo estudado, quando o valor de massa de peso foi estatisticamente diferente dos dois primeiros tempos iniciais. Apesar de serem muito pequenos, estes valores mostram uma tendência crescente ao longo de todo o período de armazenamento.

Johnston et al. (1994) citaram que vários fatores podem influenciar a perda de massa, tais como temperatura, mudança de temperatura, umidade, forma e tamanho do produto. Soares et al. (2013) reportaram que o controle adequado da temperatura de armazenamento é o fator primordial para se obter baixos valores de perda de massa.

6.3.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

Valores de pH dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias estão representados na Tabela 14.

Tabela 14. Variação do pH dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.

Filmes	pH				
	1° dia	3° dia	5° dia	7° dia	9° dia
Controle	$6,16 \pm 0,01^{dE}$	$6,25 \pm 0,02^{cD}$	$6,50 \pm 0,01^{bC}$	$6,54 \pm 0,01^{bB}$	$6,57 \pm 0,02^{aA}$
Q100GX0	$6,52 \pm 0,01^{aC}$	$6,54 \pm 0,01^{aC}$	$6,55 \pm 0,02^{aB}$	$6,56 \pm 0,02^{aAB}$	$6,57 \pm 0,01^{aA}$
Q60GX40	$6,48 \pm 0,01^{bC}$	$6,53 \pm 0,02^{aB}$	$6,54 \pm 0,02^{aB}$	$6,55 \pm 0,01^{abB}$	$6,57 \pm 0,01^{aA}$
Q50GX50	$6,28 \pm 0,01^{cD}$	$6,30 \pm 0,01^{bD}$	$6,33 \pm 0,05^{cC}$	$6,42 \pm 0,04^{cB}$	$6,56 \pm 0,02^{aA}$

^aLetras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi observado (Tabela 14) que os revestimentos influenciaram os valores de pH desde o primeiro dia de armazenamento, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram observados por Kilincceker et al. (2009) ao estudar o efeito de revestimento em filés de peixe congelado. Em todos os tratamentos, observa-se que os valores de pH aumentaram durante o período de armazenamento. Borges et al. (2013), ao estudar a vida útil de *Pacus* (*P. mesopotamicus*) armazenado em gelo, também verificaram este comportamento. Chaijan et al. (2005) reportam que o aumento do pH está relacionado com a degradação proteica, com produção de substâncias como amônia e outras aminas.

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952), o pH da carne do pescado é considerado adequado para o consumo quando este é inferior a 6,8. Nesse sentido, todos os tratamentos permitiram pH adequado para o consumo do peixe. Fan et al. (2009) constataram que quanto mais baixo o pH melhor é a inibição microbiana e consequentemente maior a vida útil das amostras de peixe. Ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana na preservação do camarão branco durante o armazenamento parcialmente congelado, Wu (2014) verificou que o grupo revestido com quitosana apresentou valor de pH inicial mais elevado do que o grupo controle, mas após dez dias o grupo controle passou a apresentar valores de pH maiores que o grupo revestido com quitosana.

6.3.4 Cor dos filés de corvina

Os parâmetros de cor foram registrados para avaliar as alterações de cor da superfície dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana. As medições de cor foram realizadas no primeiro no nono dia de armazenamento, sendo efetuadas diretamente no músculo sem interferência dos revestimentos, uma vez que estes foram removidos no momento das análises, as amostras analisadas foram as mesmas tanto no primeiro como no último dia de armazenamento, a fim de evitar qualquer discrepância, já que a cor do músculo da corvina não apresenta uniformidade.

A cor dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana durante o armazenamento pode ser visto na Tabela 15.

Tabela 15. Cor dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.

Filmes	Parâmetros de cor 1° dia			Parâmetros de cor 9° dia		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Controle	$47,89 \pm 1,11^{aB}$	$3,08 \pm 0,39^{aA}$	$-2,07 \pm 0,43^{cA}$	$51,03 \pm 0,21^{aA}$	$0,64 \pm 0,29^{bB}$	$-0,47 \pm 0,96^{cA}$
Q100GX0	$47,20 \pm 0,55^{aB}$	$1,50 \pm 0,48^{bA}$	$4,74 \pm 0,18^{aB}$	$52,27 \pm 1,61^{aA}$	$-1,32 \pm 0,30^{cB}$	$8,06 \pm 0,26^{aA}$
Q60GX40	$44,61 \pm 0,43^{bB}$	$2,35 \pm 0,46^{abA}$	$1,98 \pm 0,84^{bA}$	$46,34 \pm 0,36^{bA}$	$1,64 \pm 0,60^{aA}$	$1,40 \pm 0,50^{bA}$
Q50GX50	$44,9 \pm 0,08^{bB}$	$2,52 \pm 0,02^{aA}$	$1,27 \pm 0,03^{bA}$	$46,82 \pm 0,02^{bA}$	$1,78 \pm 0,02^{aB}$	$1,23 \pm 0,01^{bA}$

^aLetras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com a Tabela 15, observa-se um aumento do parâmetro L^* (luminosidade) em todos os tratamentos, sendo o tratamento Q100GX0 o que resultou em maior percentual (5,07%) em relação ao último dia de armazenamento. Com base no diagrama de Hunter, quanto mais alto for o valor de L^* (mais próximo de 100) mais pálido será o músculo analisado. Solval et al. (2014), ao avaliarem nanopartículas de quitosana como material de glazeamento para camarão congelado ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ por trinta dias), também encontraram um acréscimo do parâmetro L^* durante o armazenamento, embora não significativo. Chandrasekaran (1994) cita que o desbotamento da cor é uma das alterações mais importantes da qualidade do pescado durante o armazenamento. Além disso, a oxidação lipídica tem sido associada à degradação da cor durante o armazenamento (LANARI, et al., 1995).

No final desse estudo, observou-se que todos os tratamentos apresentaram menor intensidade do parâmetro a^* . Arancibia et al. (2015) ao estudarem revestimentos de quitosana enriquecido com resíduos de camarão para a preservação de camarão, verificaram aumento do parâmetro a^* durante os 14 dias de armazenamento refrigerado. Com relação ao parâmetro b^* , observa-se que houve mudanças significativas ($p < 0,05$) do 1º ao 9º dia apenas no tratamento Q100GX0, sendo também o único que apresentou acréscimo deste parâmetro com o passar do tempo. Isto possivelmente pode ser atribuído a cor amarela do revestimento puro de quitosana que provavelmente foi transferida com o passar do tempo para o músculo de corvina. Rodriguez-Turienzo et al. (2011), ao analisarem revestimentos a base de proteína do leite em filés de salmão do atlântico congelado, verificaram queda do parâmetro b^* durante o período de análise. Cortez-Vega et al. (2014) citam que a diminuição dos valores dos parâmetros a^* e b^* durante o período de armazenamento podem indicar escurecimento oxidativo.

6.3.5 Determinação de N-BVT (Bases Voláteis Totais)

Os valores de N-BVT dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, podem ser visto na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de N-BVT dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C durante 9 dias.

Filmes	Bases Voláteis Totais - N-BVT (mgN/100 g)				
	1° dia	3° dia	5° dia	7° dia	9° dia
Controle	$6,54 \pm 0,32^{aD}$	$7,66 \pm 0,32^{aC}$	$10,08 \pm 0,00^{aB}$	$10,86 \pm 0,32^{aB}$	$12,33 \pm 0,56^{aA}$
Q100GX0	$5,97 \pm 0,32^{aB}$	$6,91 \pm 0,32^{aB}$	$9,71 \pm 0,65^{aA}$	$10,27 \pm 0,32^{aA}$	$10,83 \pm 0,65^{bA}$
Q60GX40	$6,35 \pm 0,32^{aC}$	$7,65 \pm 0,32^{aBC}$	$9,15 \pm 0,85^{aB}$	$8,96 \pm 1,12^{abB}$	$10,77 \pm 0,00^{bA}$
Q50GX50	$5,97 \pm 0,32^{aC}$	$5,41 \pm 0,65^{bC}$	$9,15 \pm 0,32^{aA}$	$7,84 \pm 0,00^{bB}$	$8,41 \pm 0,56^{cAB}$

^aLetras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os valores de N-BVT dos filés de corvina refrigerados a 4 ± 1 °C oscilaram entre 5,97 a 12,35 mg de nitrogênio por 100 g de músculo durante o período analisado (Tabela 16). O tratamento controle apresentou diferença significativa a partir do terceiro dia de armazenamento, enquanto nos demais tratamentos verificou-se diferenças a partir do quinto dia de estocagem. Nesse sentido, o tratamento controle foi o que teve maior valor de N-BVT no final do período de armazenamento (12,35 mgN/100 g), em contraposição ao tratamento Q50GX50, com o menor valor (8,41 mgN/100 g).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952), o máximo aceitável de Bases Voláteis Totais (BVT) para o pescado ser considerado fresco é de 30 mg de nitrogênio por 100 g de músculo. Nesta acepção, todos os tratamentos foram considerados aceitáveis para o consumo humano durante o período de análise. Wu (2014) ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana na preservação do camarão branco parcialmente congelado durante o armazenamento reportou que o revestimento de quitosana pode retardar a formação de N-BVT.

Segundo Fan et al. (2009), N-BVT são compostas principalmente por amônia e aminas primárias, secundárias e terciárias, sendo o método amplamente utilizado como um indicador de deterioração dos tecidos musculares. O aumento das N-BVT está relacionado com a atividade das bactérias deteriorantes e enzimas endógenas (KYRANA et al., 1997). Ramezani et al. (2015), ao avaliarem filés de carpa prateada refrigerado a 4 °C durante 12 dias de armazenamento encontraram valores de N-BVT entre 11,4 e 13,3 mg de N/100 g de peixe.

6.3.6 Análises microbiológicas

Os resultados referente as quantificações de coliformes totais e coliformes termotolerantes dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17. Número Mais Provável (MNP) de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C.

Filmes	Coliformes Totais (CT)		Coliformes Termotolerantes CTT	
	NMP.g ⁻¹		NMP.g ⁻¹	
	Tempo inicial	Tempo final	Tempo inicial	Tempo final
Controle	$1,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^3$
Q100GX0	3,6	$2,3 \times 10$	3,6	23
Q60GX40	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10$	$1,1 \times 10^3$	9,2
Q50GX50	$4,3 \times 10$	9,2	$4,3 \times 10$	9,2

De acordo com a Tabela 17, pode-se observar a presença de coliformes totais e termotolerantes em todos os tratamentos e tempos estudados, o que pode estar relacionado com a contaminação do local de captura, uma vez que a microbiota do pescado recém-capturado reflete a da água onde vive (RHODES e KATOR, 1988). Assim, a presença desses microrganismos pode está vinculada às águas contaminadas da Lagoa dos Patos, local onde os peixes foram capturados. Canal et al. (2016) ao avaliarem águas superficiais da Lagoa dos Patos, constataram elevado índice de contaminação por *Escherichia coli*.

Através dos resultados, pode-se constatar que o tratamento controle foi o que apresentou maior crescimento de microrganismos, isto sugere que o uso de quitosana ou combinações de quitosana e goma xantana como revestimentos para pescado inibe o crescimento dos microrganismos estudados (Tabela 17). Não existe padrão estabelecido na legislação vigente para coliformes termotolerantes em pescado *in natura*, valores elevados destes indicam condições higiênico-sanitárias deficientes (BEGUM et al., 2010).

Filmes de gelatina-quitosana incorporado de óleos essenciais foram estudados por Gómez-Estaca et al. (2010) como agente antimicrobiano para conservação de peixes. Os resultados mostraram que o óleo essencial de tomilho inibiu o crescimento de *E. coli*. Chen et al. (2009) ao estudar a atividade antibacteriana de eugenol e nanopartículas de quitosana enxertada com carvacrol, verificaram que as nanopartículas de quitosana reduziram significativamente o crescimento de *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram-positiva).

Na Tabela 18 podem ser vistos os resultados para quantificação de *Staphylococcus aureus* e detecção de *Salmonella* dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana.

Tabela 18. Quantificação de *S. Aureus* e detecção de *Salmonella* dos filés de corvina embalados sem e com filmes à base de quitosana e goma xantana, armazenados a 4 ± 1 °C.

Filmes	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC.g ⁻¹)		<i>Salmonella</i> Presença/ausência em 25g	
	Tempo inicial	Tempo final	Tempo inicial	Tempo final
Controle	< 10	$1,6 \times 10^5$	Ausência	Ausência
Q100GX0	< 10	< 10	Ausência	Ausência
Q60GX40	< 10	$1,2 \times 10^5$	Ausência	Ausência
Q50GX50	< 10	< 10	Ausência	Ausência

De acordo com a Tabela 18 foi verificado crescimento de colônias características de bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva em todos os tratamentos e tempos. Em relação ao tempo inicial, observa-se que os tratamentos apresentaram comportamento similar quanto ao crescimento deste microrganismo, já no tempo final apenas os tratamentos Q100GX0 e Q50GX50 mantiveram o comportamento do primeiro dia, sendo que os outros tratamentos apresentaram multiplicação de microrganismos, que ficaram acima do padrão estabelecido pela legislação em vigor. A legislação vigente estabelece limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva de 10^3 UFC/g para pescado *in natura* resfriado

(BRASIL, 2001). Rao et al., (2010), ao estudarem filmes de quitosana e goma guar observaram que as películas de quitosana foram eficazes tanto contra *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus*.

Nesse estudo não foi detectada a presença de *Salmonella* nas amostras de corvina sem e com revestimento, indicando que os resultados estão dentro do padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) que é a ausência em 25 g para pescado *in natura* resfriados. Lunestad et al. (2007) reportam que o habitat de *Salmonella* é o trato intestinal do homem e dos animais; logo, a presença em pescado indica provável contaminação fecal de fontes humanas ou de animais. Assim peixes capturados em águas não poluídas estão isentos de *Salmonella*, pelo fato deste microrganismo não fazer parte da microbiota natural do peixe.

Na literatura existem diversos relatos sobre a atividade antimicrobiana da quitosana (MEHDIZADEH et al., 2012). Uma das razões apresentadas para o carácter antimicrobiano da quitosana está relacionada com a formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que os grupos amino contendo cargas positivas interagem com as membranas das células microbianas carregadas negativamente, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüentemente, na inibição microbiana (AVADI et al., 2004).

Van den Broek et al. (2015) citam que o mecanismo através do qual a quitosana atua como composto antimicrobiano não está totalmente elucidado, no entanto estes autores mencionam três hipóteses:

a) A natureza policatiônica (carga positiva) da quitosana interfere com o metabolismo bacteriano por empilhamento eletrostático (carga negativa) na superfície da célula;

b) O baixo peso molecular da quitosana que pode penetrar o núcleo da célula bloqueando a transcrição de RNA do DNA, devido a adsorção pelas moléculas de DNA;

c) A quitosana funciona como agente quelante de minerais essenciais. Nesse sentido, a xantana também funciona como quelante, já que os cátions funcionam como contraíons que se ligam aos substituintes iônicos acetila e pirúvico (KLAIC et al., 2016), potencializando a ação.

Horn et al., (2015) citam que a quitosana e a goma xantana são polieletrólitos com grupos potencialmente ionizáveis, e quando eles são misturados numa solução

aquosa, formam um complexo pela atração eletrostática. A reação de complexação entre quitosana e goma xantana ocorre devido à interação entre as cargas opostas presentes nos biopolímeros (grupo NH_3^+ da quitosana e grupo COO^- da goma xantana), ocorre também interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas. A estrutura de rede 3D formada entre os dois polímeros tem uma importante vantagem, uma vez que o processo de complexação aumenta a estabilidade mecânica e química.

De modo geral, os resultados das análises microbiológicas mostraram que a adição de goma xantana nos filmes de quitosana proporcionou melhor ou igual resposta que o filme de quitosana puro. Para o nosso conhecimento, não foram encontrados relatos na literatura que associam a interação da quitosana com a goma xantana como agente antimicrobiano.

6.4 Conclusão

Este estudo demonstrou que os filmes de quitosana combinados com goma xantana apresentaram excelentes propriedades antimicrobianas, capazes de preservar a qualidade de filés de pescado refrigerado durante o período estudado. A perda de massa dos filés de corvina não foi afetada significativamente pela adição de goma xantana nos filmes. Por outro lado, a adição de goma xantana afetou o pH e os parâmetros de cor dos filés de corvina. Também foi verificado que a combinação destes dois polímeros promoveu a redução das N-BVT, sendo o filme C50GX50 o que apresentou melhor resposta. Assim, estes filmes podem ser úteis para preservar a qualidade e estender a vida útil de filés de pescado refrigerado. Diante disso, mais estudos precisam ser realizados com aplicações destes polímeros como materiais de embalagens em alimentos, a fim de avaliar seu potencial e promover a difusão destes polímeros sobre os benefícios na qualidade de produtos alimentares.

Referências bibliográficas

AANEBY, J. **Iron Catalyzed Lipid Oxidation in Emulsions and the Influence of Antioxidants** (Master's thesis, Institut for bioteknologi), 2012.

ACOSTA, S.; JIMENEZ, A.; CHAFER, M.; GONZALEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. **Food Hydrocolloids**, 49, 135-143, 2015.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

ALEMÁN, A.; BLANCO-PASCUAL, N.; MONTERO, M. P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Simple and efficient hydrolysis procedure for full utilization of the seaweed *Mastocarpus stellatus* to produce antioxidant films. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 277-284, 2016.

AMORIM, R. G. O.; DESCHAMPS, F. C.; PESSATTI, M. L. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 967, 2016.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington, 1995.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th ed., Washington, 2000.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a ed., Washington. 2001.

ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54, p. 259-266, 2015.

ARAUJO-FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 839-848, 2010.

ARAÚJO, M. A. J. **Química dos alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 596 p.

ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 140-147, 2010.

ARGIN-SOYSAL, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 202-209, 2009.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. **American Society for Testing and Materials**, E 96-95, 1995.

ASTM. Designation D882-00: **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2000.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 7, p. 1355-1361, 2004.

BADOLATO, E. S. G.; CARVALHO, J. B.; MELLO, M. R. P. A.; TAVARES, M., CAMPOS, N. C.; AUED-PIMENTEL, S.; MORAIS, C. Composição centesimal de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 27-35, 1994.

BAILEY, A. E. **BAILEY'S Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996.

BANDARRA, N. M.; CALHAU, M. A.; OLIVEIRA, L. RAMOS, M.; DIAS, M., BARTOLO, H.; FARIA, M. R.; FONSECA, M. C.; GONÇALVES, J.; BATISTA, I.; NUNES, M. L. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. **Publicações avulsas do IPIMAR**. Lisboa. ISSN.0872 – 914X, nº 11, 2004.

BCC RESEARCH. **Global markets and technologies for bioplastics**. Report code PLS050C. 2014. Available at <http://www.bccresearch.com/market-research/plastics/bioplastics-pls050c.html>. Acesso junho 2015.

BEGUM, M.; AHMED, A. T. A.; DAS, M.; PARVEEN, S. A comparative microbiological assessment of five types of selected fishes collected from two different markets. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 5, p. 259-265, 2010.

BELLINI, M. Z.; OLIVA-NETO, P.; MORAES, Â, M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 289-299, 2015.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, F. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 2, p.227-236, 2008.

BERNARDI, D. M.; PARIS, L. D.; DIETERICH, F.; SILVA, F. G. D.; BOSCOLO, W. R.; SARY, C.; SIGNOR, A.; BERTOL, T. M.; SGARBIERI, V. C. Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, n. 4, p. 709-716, 2016.

BHASKAR, N.; SATHISHA, A. D.; SACHINDRA, N. M.; SAKHARE, P. Z.; MAHENDRAKAR, N. S. Effect of acid ensiling on the stability of visceral waste

proteases of Indian major carp Labeo. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 16, n. 1, p. 73-86, 2007.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003.

BONILLA, J.; FORTUNATI, E.; ATARES, L.; CHIRALT, A.; KENNY, J. M. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 463-470, 2014.

BORGES, A.; CONTE-JUNIOR, C. A.; FRANCO, R. M.; FREITAS, M. Q. Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination of its shelf life. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 311-317, 2013.

BORSATO, D.; CINI, J.; R., M.; SILVA, H. C.; COPPO, R. L.; ANGILELLI, K. G.; MOREIRA, I.; MAIA, E., C. R.; Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. **Fuel Processing Technology**, v. 127, p. 111-116, 2014.

BOUGATEF, A.; HAJJI, M.; BALTI, R.; LASSOUED, I.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1198-1205, 2009.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 559-565, 2010.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Decreto Nº 30691 de 29 de março de 1952. Seção 1- Capítulo 7 – Pescados e Derivados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1952.

BRASIL. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro. **Regulamento Técnico: Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Carneos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 8 set. 2015.

BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego**. Diário Oficial União, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 12, de 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/>>. Acesso em: 06 mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Balanço 2013 da Pesca e Aquicultura**. Brasília: MPA, 2013. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/>>. Acesso em: 06 mai. 2015.

BRAVERMAN, M. S.; ACHA, E. M.; GAGLIARDINI, D. A.; RIVAROSSA, M. Distribution of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest 1823) larvae in the Río de la Plata estuarine front. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 82, n. 4, p. 557-565, 2009.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 671-675, 2009.

BUGGENHOUT, J.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Impact of processing conditions on the extractability and molecular weight distribution of proteins in parboiled brown rice. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 1, p. 8-14, 2013

CANAL, N.; MENEGHETTI, K. L.; ALMEIDA, C. P. D.; BASTOS, M. D. R.; OTTON, L. M.; CORÇÃO, G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 337-344, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1895-1902, 2009.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE, C.; MELLADO, M. S. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CENTENARO, G. S. Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Rio Grande - FURG. Rio Grande - RS, 2011.

CERCEL, F.; STROIU, M.; ALEXE, P.; IANIȚCHI, D. Characterization of myofibrillar chicken breast proteins for obtain protein films and biodegradable coatings generation. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 197-205, 2015.

CERVERA, M. F.; HEINÄMÄKI, J.; KROGARS, K.; JÖRGENSEN, A. C.; KARJALAINEN, M.; COLARTE, A. I.; YLIRUUSI, J. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 5, n. 1, p. 109-114, 2004.

CHABEAUD, A.; DUTOURNIE, P.; GUERARD, F.; VANDANJON, L.; BOURSEAU, P. Application of response surface methodology to optimize the antioxidant activity of a Saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 445-455, 2009.

CHAIJIAN, M.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; & FAUSTMAN, C. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 607-617, 2005.

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.

CHANDRASEKARAN, M. Methods for preprocessing and freezing of shrimps: a critical evaluation. **Journal of Food Science and Technology (Mysore)**, v. 31, n. 6, p. 441-452, 1994.

CHEN, R. H.; LIN, J. H.; YANG, M. H. Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 1, p. 41-46, 1994.

CHEN, M. C.; YEH, G. H. C.; CHIANG, B. H. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 5, p. 379-390, 1996.

CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 4, p. 319-326, 2000.

CHEN, F.; SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-39, 2009.

CHENG, S. Y.; WANG, B. J.; WENG, Y. M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT- Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 115-121, 2015.

CHOI, Y. J.; HUR, S.; CHOI, B. D.; KONNO, K.; PARK, J. W. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. C17-C24, 2009.

CHU, C. H.; SAKIYAMA, T.; YANO, T. pH-sensitive swelling of a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 717-719, 1995.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: FAEPE, 2005. 2ª edição. 783p.

COMBS, G. F. **The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. 2. ed. New York: academic press, 1998.

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIZATO, S.; DE SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 197-202, 2014.

COSTA-JÚNIOR, E. S.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; MANSUR, A. A. P.; VASCONCELOS, W. L.; MANSUR, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 472-481, 2009.

COZZO-SIQUEIRA, A.; OETTERER, M.; GALLO, C. R. Effects of irradiation and refrigeration on the nutrients and shelf-life of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 12, n. 1, p. 85-101, 2003.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar proteinbased biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

CURCHO, M. R. D. S. M.; FARIAS, L. A.; BAGGIO, S. R.; FONSECA, B. C.; NASCIMENTO, S. M. D.; BORTOLI, M. C. D.; BRAGA, E. S.; FÁVARO, D. I. T. Mercury and methylmercury content, fatty acids profile, and proximate composition of consumed fish in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 3, p. 442-450, 2009.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; ANON, M. C.; SOBRA, P. J. A; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 341-349, 2009.

DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1296-1307, 2011.

DHANAPAL, A.; SASIKALA, P.; RAJAMANI, L.; KAVITHA, V.; YAZHINI, G.; BANU, M. S. Edible films from polysaccharides. **Food Science and Quality Management**, v. 3, p. 9-17, 2012.

DIÉGUEZ, M. C. V.; PELISSARI, F. P.; SOBRAL, P. A.; MENEGALLI, F. C. Effect of process conditions on the production of nanocomposite films based on amaranth flour and montmorillonite. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1. p. 70-79, 2015.

DONG, Y.; SHENG, G.; FU, J.; WEN, K. Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 12, p. 2033-2039, 2005.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485-1493, 2008.

DU, J.; HSIEH, Y. L. Pegylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning. **Cellulose**, v. 14, n. 6, p. 543-552, 2007.

DUMITRIU, S. Polysaccharides as biomaterials. In S. Dumitriu (Ed.), **Polymeric Biomaterials**. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.

FALLAH, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S. R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 153-157, 2015.

FAN, W.; SUN, J.; CHEN, Y.; QIU, J.; ZHANG, Y.; CHI, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 66-70, 2009.

FERNANDES, P. Enzymes in Fish and Seafood Processing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. 59, p. 1-14, 2016.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; LAGARÓN, J. M., OCIO, M. J. Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3298-3307, 2009.

FERREIRA, A. R.; TORRES, C. A.; FREITAS, F.; SEVRIN, C.; GRANDFELS, C.; REIS, M. A.; ALVES, V. D.; COELHO, I. M. Development and characterization of bilayer films of FucoPol and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 8-15, 2016.

FERREIRA, F. A. Filmes nanocompósitos antimicrobianos obtidos a partir de proteínas de pescado e nanoargila incorporados com óleos essenciais. **Tese de doutorado**. Universidade federal de Rio Grande. Rio Grande-RS. 2014.

FITZPATRICK, P.; MEADOWS, J.; RATCLIFFE, I.; WILLIAMS, P. A. Control of the properties of xanthan/glucomannan mixed gels by varying xanthan fine structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1018-1025, 2013.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Disponível em <http://www.fao.org/3/contents/d1eaa9a1-5a71-4e42-86c0-f2111f07de16/i3720e.pdf>. Acesso em 10 ago. 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em 01 jan. 2017.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 1 p.1-19, 1980.

GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 532–538, 2009.

GALLI, O.; NORBIS, W. Length-weight relationships and condition factor of two Sciaenid species *Micropogonias furnieri* and *Cynoscion guatucupa* from the Rio de la Plata and Uruguayan ocean coast, Southwestern Atlantic. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 51, n. 2, p. 347-357, 2016.

GAO, D.; CAO, Y.; LI, H. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1855-1860, 2010.

GARCÍA-MORENO, P. J.; BATISTA, I.; PIRES, C.; BANDARRA, N. M.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Food Research International**, v. 65, p. 469-476, 2014.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GE, L.; LI, X.; ZHANG, R.; YANG, T.; YE, X.; LI, D.; MU, C. Development and characterization of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 129-135, 2015.

GHRIBI, A. M.; GAFSI, I. M.; SILA, A.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BOUGATEF, A.; BESBES, S. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, v. 187, p. 322-330, 2015.

GIRGIH, A. T.; HE, R.; HASAN, F. M.; UDENIGWE, C. C.; GILL, T. A.; ALUKO, R. E. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 173, p. 652-659, 2015.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889-896, 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; CATALÁ, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. The potential of proteins for producing food packaging materials: a review. **Packaging Technology and Science**, v. 29, p. 203-224, 2016.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, JEAN-LOUIS.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GUERARD, F.; DECOURCELLE, N.; SABOURIN, C.; FLOCH-LAIZET, C.; LE GREL, L.; LE FLOCH, P.; GOURLAY, F.; LE DELEZIR, R.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. **Journal des Sciences Halieutique et Aquatique**, v. 2, p. 21-27, 2010.

GUO, J.; GE, L.; LI, X.; MU, C.; LI, D. Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 243-250, 2014.

HAIMOVICI, M.; UMPIERRE, R. G. Variaciones estacionales en la estructura poblacional del efectivo pesquero da corvina branca (*Micropogonias furnieri*) en el extremo sul de Brasil. **Atlântica, Rio Grande**, v. 18, p. 179-203, 1996.

HAIMOVICI, M.; CARDOSO, L. G.; UNPIERRE, R. G. Stocks and management units of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) in southwestern Atlantic. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 1080, 2016.

HAINES, PETER J. Thermal methods of analysis: principles, applications and problems. Springer Science & Business Media, 2012.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A; GUZZI PLEPIS, A. M. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 225-230, 2015.

HU, G.; CHEN, J.; GAO, J. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 291-298, 2009.

HUNTERLAB. **The Color Management Company, Universal softwar**. Version 3.2. Reston, 1997.

ISAAC, V. J. Synopsis of biological data on the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). **FAO Fisheries Synopsis**, n. 150, p. 35, 1988.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975.

JE, J. Y.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 840–846, 2007.

JE, J. Y.; LEE, K. H.; LEE, M. H.; AHN, C. B. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1266-1272, 2009.

JOHNSTON, W. A.; NICHOLSON, F. J.; ROGER, A.; STROUD, G. D. **Freezing and refrigerated storage in fisheries**. FAO Fisheries Technical Paper 340, Food and Agriculture Organization, Rome, 1994.

JUN, S.; PARK, P.; JUNG, W.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 1, p. 20-26, 2004.

KAHL, R.; KAPPUS, H. Toxikologie der synthetischen Antioxidantien BHA und BHT im Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 196, n. 4, p. 329-338, 1993.

KALIKOSKI, D. C.; VASCONCELLOS, M. **Estudo das condições técnicas, econômicas e ambientais da pesca de pequena escala no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil: uma metodologia de avaliação**. FAO Fisheries and Aquaculture Circular N°. 1075. Rome, FAO. 200 p, 2013.

KARAMAĆ, M.; KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; KULCZYK, A. Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1027, 2016.

KARBOWIAK T.; GOUGEON, R. D.; RIGOLET, S.; DELMOTTE, L.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. **Food Chemistry**, v. 106, n. 4, p. 1340-1349, 2008.

KILINCCEKER, O.; DOGAN, I. S.; KUCUKONER, E. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 868-873, 2009.

KIM, S.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2010.

KIM, U. J.; LEE, Y. R.; KANG, T. H.; CHOI, J. W.; KIMURA, S.; WADA, M. Protein adsorption of dialdehyde cellulose-crosslinked chitosan with high amino group contents. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

KLAIC, P. M. A.; VENDRUSCOLO, C. T.; FURLAN, L.; SILVEIRA, M. A. Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 118-126, 2016.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2008.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945-960, 2006.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline protease and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry** v. 36, n. 1, p. 131-139, 2000.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KYRANA, V. R.; LOUGOVOIS, V. P.; VALSAMIS, D. S. Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 32, n. 4, p. 339-347, 1997.

LAGUERRE, Mi.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LANARI, M. C.; SCHAEFER, D. M.; CASSENS, R. G.; SCHELLER, K. K. Atmosphere and blooming time affect color and lipid stability of frozen beef from steers supplemented with vitamin E. **Meat Science**, v. 40, n. 1, p. 33-44, 1995.

LAROQUE, D.; CHABEAUD, A.; GUÉRARD, F. Antioxidant capacity of marine protein hydrolysates. **Added value to fisheries waste, Transworld Research Network, Kerala**, p. 147-161, 2008.

LAWAL, O. S., ADEBOWALE, K. O., OGUNSANWO, B. M., BARBA, L. L., ILO, N. S. Oxidized and acid thinned starch derivatives of hybrid maize: functional characteristics, wide-angle X-ray diffractometry and thermal properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 1, p. 71-79, 2005.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Functional properties of chitosan-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 339-346, 2013a.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 889-899, 2013b.

LEE, S. B.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H. Preparation and properties of polyelectrolyte complex sponges composed of hyaluronic acid and chitosan and their biological behaviors. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 4, p. 925-932, 2003.

LEE, S.; QIAN, Z.; KIM, S. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 96-102, 2010.

LEUANGSUKRERK, M.; PHUPOKSAKUL, T.; TANANUWONG, K.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; JANJARASSKUL, T. Properties of konjac glucomannan–whey protein isolate blend films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 94-100, 2014.

LI, B.; KENNEDY, J. F.; JIANG, Q. G.; XIE, B. J. Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannan e gelatin. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 544-549, 2006.

LI, Y.; SADIQ, F. A.; FU, L.; ZHU, H.; ZHONG, M.; SOHAIL, M. Identification of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of razor clam *Sinonovacula constricta*. **Marine Drugs**, v. 14, n. 6, p. 110, 2016.

LIASET, B.; MADSEN, L.; HAO, Q.; CRIALES, G.; MELLGREN, G.; MARSCHALL, H.; HALLENBORG, P.; ESPE, M.; FROYLAND, L.; KRISTIANSEN, K. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 4, p. 254-262, 2009.

LIMA, M. M.; CARNEIRO, L. C.; BIANCHINI, D.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE, C.; SILVEIRA A. S. Structural, thermal, physical, mechanical, and barrier properties of chitosan films with the addition of xanthan gum. **Journal of Food Science**, 2017a.

LIMA, M. M.; BIANCHINI, D.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE, C.; SILVEIRA A. S. Biodegradable films based on chitosan, xanthan gum, and fish protein hydrolysate. **Journal of Applied Polymer Science**, 2017b.

LIN, C. C.; LIANG, J. H. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 530-533, 2002.

LIRA, T. B. F. Avaliação das variáveis que influenciam o grau de hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) Moxotó. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.

LISTRAT, A.; LEBRET, B.; LOUVEAU, I.; ASTRUC, T.; BONNET, M.; LEFAUCHEUR, L.; PICARD, B.; BUGEON, J. How muscle structure and composition

influence meat and flesh quality. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1-14; 2016.

LIU, S.; ZHAO, P.; ZHANG, J.; XU, Q.; DING, Y.; LIU, J. A comparative study of physicochemical and functional properties of silver carp myofibrillar protein glycated with glucose and maltodextrin. **RSC Advances**, v. 7, n. 2, p. 1008-1015, 2017.

LUNESTAD, B. T.; NESSE, L.; LASSEN, J.; SVIHUS, B.; NESBAKKEN, T.; FOSSUM, K.; ROSNES, J. T.; KRUSE, H.; YAZDANKHAH, S. *Salmonella* in fish feed; occurrence and implications for fish and human health in Norway. **Aquaculture**, v. 265, n. 1, p. 1-8, 2007.

LUZIA, L. A.; SAMPAIO, G. R.; CASTELLUCCI, C. M.; TORRES, E. A. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. **Food Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 93-97, 2003.

MA, Q.; ZHANG, Y.; CRITZER, F.; DAVIDSON, P. M.; ZIVANOVIC, S.; ZHONG, Q. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 533-542, 2016.

MAGAÑA, M. D.; SEGURA-CAMPOS, M.; DÁVILA-ORTIZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. Propriedades inibidoras de ACE-I de hidrolisados de proteínas de *Phaseolus lunatus* germinadas e não germinadas. **Food Science and Technology** (Campinas.), v. 35, n. 1, p. 167-174, 2015.

MAGNIN, D.; LEFEBVRE, J.; CHORNET, E.; DUMITRIU, S. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 4, p. 437-453, 2004.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; HERNANDEZ, C. P. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MARTINS, M. J. O. Eficiência de antioxidantes em biodiesel. **Tese de Doutorado**. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2010.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220-227, 2012.

MARTINS, C. A. A.; RENNER, M. A. G. Industrialização de pescado no município do Rio Grande: da gênese ao final do século XX. **Geosul**, v. 29, n. 58, p. 29-72. 2014.

MATTA JUNIOR, M. D.; SARMENTO, S. B. S.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ZOCCHI, S. S. Propriedades de Barreira e Solubilidade de Filmes de Amido de Ervilha Associado com Goma Xantana e Glicerol. **Polímeros**, São Carlos, v. 21, n. 1, p. 1- 6, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds**. CRC Press, 2014.

MEHDIZADEH, T.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; OROMIEHIE, A. R. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyianus* essential oil. **Veterinary Research Forum**.3, 167-173, 2012.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1289-1295, 2003.

MILES, K. B.; BALL, R. L.; MATTHEW, H. W. T. Chitosan films with improved tensile strength and toughness from N-acetyl-cysteine mediated disulfide bonds. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 1-9, 2016.

MÖLLER, N.; SCHOLZ-AHRENS, K.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MU, C.; GUO, J.; LI, X.; LIN, W., LI, D. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 22-29 2012.

MUNE, M. M. A. Influence of degree of hydrolysis on the functional properties of cowpea protein hydrolysates. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2386-2392, 2015.

MUT-SALUD, N.; ÁLVAREZ, P. J.; GARRIDO, J. M.; CARRASCO, E.; ARÁNEGA, A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, F. Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results. **Oxidative Medicine and Cellular longevity**, v. 2016, p. 1-19, 2015.

MUZAIFA, M.; SAFRIANI, N.; ZAKARIA, F. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. **International Journal of the Bioflux Society**, v. 5, p. 36-39, 2012.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1354-1362, 2011.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178-185, 2012.

NAKAJIMA, K.; YOSHIE-STARK, Y.; OGUSHI, M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 844-851, 2009.

NEHETE, J. Y.; BHAMBAR, R. S.; NARKHEDE, M. R.; GAWALI, S. R. Natural proteins: sources, isolation, characterization and applications. **Pharmacognosy reviews**, v. 7, n. 14, p. 107, 2013.

NILSANG S.; LERTSIRI S.; SUPHANTHARIKA M. Optimization of Enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**. University of California, v. 70, n. 4, p. 571-578, Davis, California, 2005.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca**. São Paulo: Livraria Varela, 1999.

OLIVEIRA, C. F.; CORRÊA, A. P. F.; COLETTI, D.; DAROIT, D. J.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2668-2678, 2015.

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos volume 1: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PACHECO-AGUILAR, R.; MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 782-789, 2008.

PARK, S. Y.; MARSH, K. S.; RHIM, J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan film affected by the type of organic solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 194-197, 2002.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 272-280, 2013.

PEREIRA JR. V. A.; ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (*Red Cabbage*) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180-188, 2015.

PÉREZ-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1034-1037, 1999.

PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 53-61, 2009.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

PLÁCIDO, G. R. Extração, caracterização e uso da queratina de penas de frango para a obtenção de filmes biodegradáveis. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 128 p., 2007.

PORTA, R.; DI PIERRO, P.; ROSSI-MARQUEZ, G.; MARINIELLO, L.; KADIVAR, M., ARABESTANI, A. Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 102-107, 2015.

PRABHA, J.; VINCENT, S.; JOSEPH, S.; MAGDALENE, J. Bioactive and functional properties of fish protein hydrolysate from *Leiognathus bindus*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. 277-281, 2016.

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; ARTHAN, A. Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 605-614, 2007.

PUCCI, M. S.; SHROFF, R. N. Correlation of blown film optical properties with resin properties. **Polymer Engineering & Science**, v. 26, n. 8, p. 569-575, 1986.

QIAN, Z.; JUNG, W.; KIM, S. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1690-1698, 2008.

RAHDAR, A.; ALMASI-KASHI, M. Dynamic light scattering of nano-gels of xanthan gum biopolymer in colloidal dispersion. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 5, p. 635-641, 2016.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 562-569, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMEZANI, Z.; ZAREI, M.; RAMINNEJAD, N. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. **Food Control**, v. 51, p. 43-48, 2015.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAO, M. S.; KANATT, S. R.; CHAWLA, S. P.; SHARMA, A. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1243-1247, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 727-736, 2008.

RHODES, M. W.; KATOR, H. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2902-2907, 1988.

RICHARDSON, ROBERT K.; ROSS-MURPHY, SIMON B. Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 2: Xanthan polysaccharide solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, n. 5, p. 257-264, 1987.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 531-539, 2009.

RODRIGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A.; MORENO, V.; CARIDE, A.; VIEITES, J. M.; DIAZ, O. Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): Influence of the plasticiser and the moment of coating on quality preservation. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 187-194, 2011.

RUBENTHEREN, V.; WARD, T. A.; CHEE, C. Y.; NAIR, P.; SALAMI, E.; FEARDAY, C. Effects of heat treatment on chitosan nanocomposite film reinforced with nanocrystalline cellulose and tannic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 202-208, 2016.

SALGADO, P. R.; FERNÁNDEZ, G. B.; DRAGO, S. R.; MAURI, A. N. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1433-1440, 2011.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; HERNANDEZ, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1302-1310, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANDFORD, P. High purity chitosan and alginate: Preparation, analysis and applications. In R. Chandrasekaran (Ed.), **Frontiers in Carbohydrate Research-2**. London: Elsevier, 1992.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G. D.; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 36, n. 2, p. 375-381, 2016.

Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), 2007. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Acesso em jan. 2015. Disponível em: www.seap.gov.br.

SENANAYAKE, S. P. J. N. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1529-1541, 2013.

SHAHBAZI, M.; RAJABZADEH, G.; ETTALAIE, R.; RAFE, A. Kinetic study of κ -carrageenan degradation and its impact on mechanical and structural properties of chitosan/ κ -carrageenan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 167-176, 2016.

SHARIATINIA, Z.; FAZLI, M. Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 112-124, 2015.

SHEIH, I.; FANG, T.; WU, T. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 279-284, 2009.

SHERWIN, E. R. Antioxidants. In: **Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives**. New York: MARCEL DEKKER, 1995.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A. J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v. 35, p.421-463, 2012.

SLIZYTE, R.; ROMMI, K.; MOZURAITYTE, R.; ECK, P.; FIVE, K.; RUSTAD, T. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 99-109, 2016.

SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 3, p.449-454, 2005.

SOARES, N. M.; MENDES, T. S.; VICENTE, A. A. Effect of chitosan-based solutions applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation-A pilot-scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 316-323, 2013.

SOARES, N. M.; OLIVEIRA, M. S.; VICENTE, A. A. Effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 524-531, 2015.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1251-1255, 2011.

SOLVAL, K. M.; RODEZNO, L. A. E.; MONCADA, M.; BANKSTON, J. D.; SATHIVEL, S. Evaluation of chitosan nanoparticles as a glazing material for cryogenically frozen shrimp. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 172-180, 2014.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149-155, 2001.

SOUSA, G. M. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca. **Dissertação de mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás- UFG, 89 p., 2012.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; CASARIEGO, A.; LIMA, A. M. P.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2110-2115, 2009.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; MARTINS, J. T.; CASARIEGO, A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 330-335, 2010.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

SUPPAKUL, P.; CHALERNSOOK, B.; RATISUTHAWAT, B.; PRAPASITTHI, S.; MUNCHUKANGWAN, N. Empirical modeling of moisture sorption characteristics and mechanical and barrier properties of cassava flour film and their relation to plasticizing-antiplasticizing effects. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 290-297, 2013.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

THAKHIEW, W.; CHAMPAHOM, M.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Improvement of mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment of film-forming solution. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 66-72, 2015.

VALENCIA-CHAMORRO, S. A.; PALOU, L.; DEL RÍO, M. A.; PÉREZ-GAGO, M. B. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p. 872-900, 2011.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J.I.; KAPPEN, F. H.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 341-349, 2005.

VERCRUYSSSE, L.; VAN CAMP, J.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8106-8115, 2005.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, edição especial, p. 99-102, 2006.

WAN, Y.; WU, H.; YU, A.; WEN, D. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1362-1372, 2006.

WEI, X.; PANG, J.; ZHANG, C.; YU, C.; CHEN, H.; XIE, B. Structure and properties of moisture-resistant konjac glucomannan films coated with shellac/stearic acid coating. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 119-125, 2015.

WITSCHI, H. P. Enhanced tumour development by butylated hidroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. **Food Chemical and Toxicology**, Oxford, v.24, n.10-11, p.1127-1130, 1986.

WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, n. 9, p. 949-957, 2003.

WU, J.; ZHONG, F.; LI, Y.; SHOEMAKER, C. F.; XIA, W. Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 82-91, 2013.

WU, S. Effect of chitosan-based edible coating on preservation of white shrimp during partially frozen storage. **International journal of biological macromolecules**, v. 65, p. 325-328, 2014.

WURTZEN, G. Scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake. Case study: butylated hydroxyanisole (BHA). **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 3, p. 307-314, 1993.

XU, Y.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 551-555, 2011.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1167-1173, 2010.

YOUSSEF, A. M.; ABOU-YOUSEF, H.; EL-SAYED, S. M.; KAMEL, S. Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 25-32, 2015.

YU, T. Y.; MORTON, J. D.; CLERENS, S.; DYER, J. M. Cooking-Induced Protein Modifications in Meat. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 141-159, 2017.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CORNEJO-VILLEGAS, M. A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut "Red Delicious" apples. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 188-196, 2014.

ZAVAREZE, E. R. Aplicação de hidrolisado proteico com peptídeos bioativos nanoencapsulados em filmes elaborados a partir de proteínas de pescado. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande-RS, 2012.

ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; EL HALAL, S. L. M.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, L. M.; CASTRO, L. A. S.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 841-848, 2014.

ZEMLJIČ, L. F.; TKAVC, T.; VESEL, A.; ŠAUPERL, O. Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material. **Applied Surface Science**, v. 265, p. 697-703, 2013.

ZHANG, C.; DING, Y.; PING, Q.; YU, L. L. Novel chitosan-derived nanomaterials and their micelle-forming properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8409-8416, 2006.

ZHU, G.; SHENG, L.; TONG, Q. Preparation and characterization of carboxymethylgellan and pullulan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 341-347, 2014.

ZIANI, K.; OSES, J.; COMA, V.; MATE, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159-2165, 2008.